KALTSENSITIVE MUTANTEN DES BAKTERIOPHAGEN LAMBDA

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
der Mathematisch-naturwissenschaftlichen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von

James H. Cox
aus Calumet City, Illinois, USA

1969

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547611_0039

KALTSENSITIVE MUTANTEN DES BAKTERIOPHAGEN LAMBDA

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

der Mathematisch-naturwissenschaftlichen Fakultät

der Eberhard-Karls-Universität

zu Tübingen

vorgelegt von

James H. Cox

aus Calumet City, Illinois, USA

1969

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Tag der mündlichen Prüfung: 16. Oktober 1969

Dekan: Professor Dr. A. Seilacher

1. Berichterstatter: Professor Dr. W. Seyffert

2. Berichterstatter: Professor Dr. W. Schäfer

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
I.	EINLEITUNG und PROBLEMSTELLUNG	1
	1) Der Bakteriophage Lambda	1
	2) Die Genetik des Bakteriophagen Lambda. Bedingt letale Mutanten	5
	3) Biochemische Ergebnisse zur Lambda-Genetik	13
	4) Kaltsensitive Mutanten als Mittel zur weiteren Analyse des Lambda Systems	14
	5) Kaltsensitive Mutanten bei E.coli, T4, T1 und ØX-174	16
II.	EXPERIMENTELLER TEIL	18
	1) Material und Methoden	18
	2) Isolierung kaltsensitiver Mutanten von Lambda und 434hy	21
	3) Kartierung der kaltsensitiven Mutanten	26
	4) Komplementierungsversuche kaltsensitiver Mutanten in vivo und in vitro	31
	5) Mutanten, die gleichzeitig kaltsensitiv und temperatursensitiv, bzw. suppressorsensitiv sind	38
	6) Besonderheiten einzelner kaltsensitiver Mutanten	39
III.	DISKUSSION	43
IV.	ZUSAMMENFASSUNG	49
V.	ABBILDUNGEN 1 und 2	50-53
VI.	TABELLEN 1 bis 8	54-74
VII.	LITERATURVERZEICHNIS	75-81

I. EINLEITUNG und PROBLEMSTELLUNG

1) Der Bakteriophage Lambda

Am Bakteriophagen Lambda sind in den letzten Jahren in zunehmendem Maße genetische, biochemische und biophysikalische Untersuchungen ausgeführt worden, er ist zu einem bevorzugten Objekt molekularbiologischer Forschung geworden. Zur Erläuterung der eigenen Problemstellung sei hier zunächst versucht, das heutige Bild dieses Phagensystems in großen Zügen nachzuzeichnen. Das Lambdagenom liegt im reifen extracellulären Phagen als eine zusammenhängende Doppelstrang-DNS von etwa 48.000 Basenpaaren vor (11,24,38,51,53), eingeschlossen in einem ikosaedrischen Kopf (19), an den ein flexibler Schwanz angeschlossen ist (33). Mit Hilfe dieses Schwanzes kann sich der Phage an spezifische Rezeptoren auf für ihn empfänglichen bakteriellen Wirten, hauptsächlich Stämmen von Escherichia coli (E.coli) K12, anheften und die Wirtszelle unter Einschleusung seiner DNS infizieren. Folge einer solchen Infektion können zwei sehr verschiedene Abläufe sein, die lytische und lysogene Antwort. Im Falle der lytischen Antwort wird etwa 5 Minuten nach der Infektion Phagen-DNS-Vermehrung in semikonservativer Weise unter dem Einfluß von Phagengenen eingeleitet (58). Dabei scheint auch das DNS-Synthesesystem des Wirts eine Rolle zu spielen, da in Bakterienmutanten, deren DNS-Synthese bei höherer Temperatur gestoppt ist (4), unter den

gleichen Bedingungen auch keine Vermehrung von Lambda stattfindet (46).

Später, 10 bis 20 Minuten nach der Infektion, beginnt in den infizierten Zellen die Ablesung der an der Synthese von Kopf und Schwanz des Bakteriophagen beteiligten Gene (52). Die DNS des Phagen wird anschließend in Phagenköpfe gepackt. Es kann nachgewiesen werden, daß sich an den 5'-Enden des Phagenchromosoms etwa 20 Nucleotide lange, komplementäre Einzelstrangbereiche befinden. Bei späterer Infektion einer neuen Wirtszelle werden diese Enden so miteinander verbunden, daß das Lambdachromosom in eine doppelt kovalent gebundene Ringform übergeht (32,50,56,58). Nach etwa 50 Minuten beginnen die infizierten Zellen unter dem Einfluß von Phagengenen (9,23) zu lysieren und einen Wurf von bis zu 150 Phagen freizusetzen.

Im Gegensatz dazu besteht die lysogene Antwort in der Herstellung eines Zustandes, in dem die eben erwähnten, zu Phagenvermehrung und Zelltod führenden Phagen-Funktionen durch eine spezielle Substanz, den Immunrepressor, unterdrückt sind; der Immunrepressor ist ein Genprodukt des Phagen (31).

Im engeren Sinne bedeutet die Lysogenisierung darüberhinaus, daß das infizierende Phagengenom unter der Kontrolle eines phagenspezifischen Enzyms (21,22) an einer definierten Stelle des Bakterienchromosoms linear integriert wird. Diese Stelle liegt in unmittelbarer Nachbarschaft der Gal-Gene von E.coli K12,

in der üblichen Schreibweise auf der rechten Seite. Zellen mit derart integriertem und reprimiertem Phagengenom sind vermehrungsfähig und zwar so, daß bei jeder Vermehrung des bakteriellen Chromosoms eine synchrone Vermehrung des integrierten Phagengenoms stattfindet. Auf diese Weise entstehen neue, für den betreffenden Phagen lysogene Bakterienstämme. Diese "Lysogene" sind permanente Träger der genetischen Information des in ihnen integrierten Phagen, der als Prophage bezeichnet wird. Im allgemeinen tritt die genetische Information des Phagen schon dadurch wieder in Erscheinung, daß die Repression der Phagen-Funktionen mit einer gewissen Wahrscheinlichkeit verloren geht und eine lysogene Zelle infolgedessen - ähnlich wie eine infizierte Zelle - zur lytischen Antwort, auch vegetativer Zyklus genannt, veranlaßt wird. Dieses Freisetzen reifer Phagen von seiten einzelner Zellen ist aber nicht eine notwendige Folge des lysogenen Zustandes, sie unterbleibt z.B. in Lysogenen, in denen der bereits erwähnte Immunrepressor nicht mit hinreichender Wahrscheinlichkeit unwirksam gemacht werden kann, sei es aufgrund einer Mutation im entsprechenden Gen des Prophagen oder aufgrund einer Eigenschaft des lysogenen Wirtes. Solche Lysogene werden als nicht induzierbare Lysogene bezeichnet. Eine weitere Vielfalt von Möglichkeiten stellen die sogenannten defektlysogenen Stämme dar. Bei ihnen findet zwar gelegentlich eine Inaktivierung des Immunrepressors statt, so daß gewisse phagenspezifische Funktionen in Tätigkeit treten, im wei-

teren Verlauf des vegetativen Zyklus fehlen jedoch infolge eines genetischen Defekts Funktionen, die zur Ausbildung reifer Phagen und ihrer Freisetzung erforderlich sind.

Die Eigenschaft der Immunität gegenüber der Infektion mit Phagen, die genetisch dem Prophagen gleich oder von solchen durch Mutation abgeleitet sind, ist für alle bisher erwähnten Lysogene charakteristisch. Solche Phagen werden als dem Prophagen homoimmune bezeichnet. Die Immunität ist bedingt durch das Vorhandensein des schon erwähnten Immunrepressors in der lysogenen Zelle. Sie besteht nach heutiger Kenntnis in der Unterdrückung der verschiedensten Funktionen, die der überinfizierende Phage in einer Wirtszelle ausüben könnte, mit alleiniger Ausnahme der Synthese des Immunrepressors. Im besonderen ist erwiesen, daß Gene zur Einleitung der Phagen-DNS-Synthese und Gene, deren Funktion den Wirt tötet, nicht aktiv werden (22,35). Die Herstellung Phagen-spezifischer Enzyme und insbesondere aller Phagenbestandteile ist unterbunden (22). Außerdem wird das erwähnte System für die Integration der DNS des überinfizierenden Phagen in das Bakterienchromosom nicht wirksam, d.h. die Wahrscheinlichkeit von Überlysogenisierungen in dem Sinne, daß fortan die genetische Information des überinfizierten Phagen zusätzlich zu der des ursprünglichen Prophagen erblich weitergegeben wird, ist sehr gering (10). Der Immunrepressor bewirkt auch eine direkte Inhibierung der DNS-Synthese des Phagen. Dies zeigt sich, wenn dieselbe Zelle

gleichzeitig mit einem verwandten, aber nicht reprimierten (heteroimmunen - siehe unten) Phagen infiziert ist. Es vermehrt sich nur der heteroimmune Phage, obwohl alle Produkte der Gene in trans-Stellung vorhanden sind (54).

2) Die Genetik des Bakteriophagen Lambda.

Bedingt letale Mutanten

Das oben in seinen Hauptzügen gezeichnete Bild entstand in engem Zusammenhang mit der Entwicklung der Lambda-Genetik, d.h. mit der Isolierung und Kennzeichnung von Mutanten des Phagen.

Historisch nahm die Lambda-Genetik ihren Anfang mit Plaque-Typ- und Wirtsbereich-Mutanten. Mit ihrer Hilfe konnte gezeigt werden, daß in einer Kreuzung, d.h. bei gleichzeitiger Infektion eines Wirtsbakteriums mit verschiedenen Mutanten, eine Umkombination bestimmter Merkmale, d.h. genetische Rekombination stattfinden kann. Aufgrund der beobachteten Rekombinationshäufigkeiten ließen sich die verschiedenen Gene für die damals bekannten Merkmale in einer linearen Genkarte anordnen. Die Rekombinationshäufigkeiten zeigen eine gewisse negative Interferenz (29).

Ein entscheidender Fortschritt zur Analyse des Systems wurde mit der Einführung bedingt letaler Mutanten erzielt. Insbesondere sind in diesem Zusammenhang die sogenannten suppressorsensitiven (Sus)-Mutanten (7)

wichtig. Wie spätere Analysen gezeigt haben, sind diese Mutanten durch ein UAG- oder UAA-Codon in der zugehörigen m-RNS gekennzeichnet, das im nichtpermissiven Wirt zum Kettenabbruch in der Proteinsynthese führt. In permissiven Stämmen gibt es dagegen eine spezielle Transfer-RNS, die das Codon lesen kann und daher den Kettenabbruch an dieser Stelle teilweise verhindert. Ein Kettenabbruch hat zur Folge, daß Sus-Mutanten, die in vielen, wenn nicht allen Strukturgenen für Proteine isoliert werden können, zum meist vollständigen Ausfall der Funktion des entsprechenden Cistrons führen. Im permissiven Wirt kann ein durch einen Aminosäureaustausch abgewandeltes Protein in vielen Fällen die Funktion des nichtmutierten Proteins wahrnehmen (5). Sus-Mutanten stellen daher ein geeignetes Werkzeug dar, um den entsprechenden Phagen im permissiven Wirt einerseits fortpflanzen zu können, andererseits den Ausfall der jeweiligen Gen-Funktion im nichtpermissiven Wirt zu studieren. Experimentell von Bedeutung ist die Tatsache, daß sich in verschiedenen Genen suppressorsensitive Mutanten bei Mischinfektion eines nichtpermissiven Wirtsbakteriums komplementieren. Dadurch wird eine Gruppierung der Sus-Mutanten in Cistren möglich:

Eine Nichtkomplementierung zweier Sus-Mutanten in diesem Test macht es wahrscheinlich, daß sie dieselbe Polypeptidkette, Komplementierung dagegen, daß sie verschiedene Polypeptidketten betreffen. Bei der Kartierung der Sus-Mutanten wurde anstelle paarweiser Kreuzungen

hauptsächlich das Verfahren der Deletions-Kartierung angewandt (7). Es sei hier darauf hingewiesen, daß die Kolinearität der durch Rekombinationswerte definierten genetischen Karte mit dem die genetische Information übertragenden DNS-Molekül in Lambda als einem der ersten Systeme nachgewiesen wurde. Dies geschah weitgehend mit Hilfe von Sus-Mutanten (24).

Ein neueres elektronenmikroskopisches Verfahren erlaubt es sogar, die Lage und Ausdehnung von Deletionen im Lambda-Chromosom quantitativ, d.h. in DNS-Längen, festzustellen (13). In Abbildung 1 wird die genetische Karte von Lambda nach einer vor kurzem veröffentlichten Übersicht wiedergegeben (15).

Die einzelnen für den vegetativen Zyklus erforderlichen Funktionen von Lambda seien in der ungefähren Reihenfolge ihres Auftretens besprochen:
Ausfall der Funktion N bewirkt, daß ein Lambda-spezifisches Enzym, die Exonuclease, nicht gebildet wird (45); daß DNS-Synthese zwar einsetzt aber nicht in vollem Umfang aufrechterhalten werden kann (40); daß spätere RNS nicht gebildet (28,49) und Zell-Lysis nicht induziert wird (7).
Der Funktion N wird ein allgemein positiver Kontrolleinfluß zugeschrieben, ohne daß seine Angriffspunkte im einzelnen heute schon bekannt wären.
Die Funktionen O und P sind erforderlich für die Ingangsetzung Lambda-spezifischer DNS-Synthese (28).
Die Funktion Q scheint zur Ingangsetzung aller späteren Funktionen, d.h. der Funktion R und der

Funktionen A bis J erforderlich zu sein. Das Vorhandensein der Funktion Q ist aber nur eine von zwei Voraussetzungen hierfür, die andere ist die Existenz der Lambda-DNS-Synthese (14). R ist das Strukturgen für ein Phagen-Lysozym (9). Die Cistren A bis D sind zur Herstellung im Elektronenmikroskop sichtbarer, mit DNS gefüllter Phagenköpfe erforderlich, die Funktionen E und F zur Herstellung von Phagenköpfen überhaupt (34).
Die Cistren G bis J sind für das Auftreten von Phagenschwänzen (55) verantwortlich.

Eine weitere Klasse bedingt letaler Mutanten sind die sogenannten temperatursensitiven Mutanten, bei Lambda speziell solche, die bei 30° C Plaquebildung, dagegen bei 42° C im Gegensatz zum Wildtyp keine Plaquebildung mehr zeigen (6). Diese temperatursensitiven Mutanten können im nichtpermissiven Wirt in Komplementierungsversuchen auch mit Sus-Mutanten verwendet und daher in dasselbe System von Cistren eingeordnet werden. Einige neue Cistren sind mit Hilfe von suppressor- und temperatursensitiven Mutanten im Laufe der letzten Jahre aufgefunden worden (41). Temperatursensitive Mutanten sind von besonderem Wert, wenn ein Protein als Produkt eines bestimmten Strukturgens nachgewiesen werden soll.

Auch die Kenntnis der Vorgänge bei der Lysogenisierung geht weitgehend auf das Studium entsprechender Mutanten zurück. An erster Stelle stehen hier die klassischen Plaquetyp-Mutanten in den Cistren C_I, C_{II} und

C_{III} (30). Nach Infektion einer Wirtszelle mit einer dieser Mutanten ist die Wahrscheinlichkeit der lysogenen Antwort sehr viel geringer als nach entsprechender Infektion mit dem Wildtyp. Die Mutante bildet daher klare Plaques im Gegensatz zu den trüben des Wildtyps. C_I-, C_{II}- und C_{III}-Mutanten unterscheiden sich nicht nur im Phänotyp, sondern vor allem in der Fähigkeit, sich bei der Herstellung des lysogenen Zustandes nach Mischinfektion gegenseitig zu komplementieren. Das Cistron C_I ist das Strukturgen für den bereits erwähnten Immunrepressor. Außer den klassischen C_I-Mutanten, die missense- oder nonsense-Mutanten in diesem Cistron sein müssen, sind andere Phänotypen bekannt geworden. Man beobachtet Sus-Mutanten, die auf einem permissiven Wirt trübe Plaques bilden und zur Lysogenisierung führen, auf einem nichtpermissiven Wirt dagegen klare Plaques und nicht lysogenisieren (27). Weiterhin kennen wir temperatursensitive Mutanten, die bei niederen Inkubationstemperaturen trübe, bei höheren klare Plaques bilden. Lysogene dieser Mutanten werden nur bei niederer Temperatur gebildet und bleiben nur bei niederer Temperatur stabil (35). Außerdem finden sich im C_I-Gen Mutanten mit fehlender Induzierbarkeit (ind^-) durch ultraviolettes Licht (26) und solche, bei denen diese Induzierbarkeit erheblich gesteigert ist (ind^s) (25). Über die Cistren C_{II} und C_{III} ist neben ihrer Lage auf der genetischen Karte zuverlässig nur bekannt, daß sie zur Herstellung des lysogenen Zustandes erforderlich sind (30). Ist dieser Zustand

erreicht, so sind die Funktionen C_{II} und C_{III} nicht nur zu seiner Aufrechterhaltung unnötig, sondern auch tatsächlich inaktiv (3).

Stabile Lysogenisierung tritt nur ein, wenn der infizierende Phage als Prophage in eine spezifische Position des Bakterienchromosoms oder in ein Episom des Bakteriums integriert wird. Diese Integration findet nach einem Modell von Campbell (8) und mehreren experimentellen Arbeiten, die dieses Modell stützen, folgendermaßen statt:
Das ursprünglich lineare Phagen-DNS-Molekül schließt sich nach der Infektion zu einem in beiden Strängen kovalent gebundenen Ring. Dieser Ring rekombiniert an einer von der des Ringschlusses verschiedenen spezifischen Stelle mit dem Bakterienchromosom, so daß schließlich der Prophage als Teil des Bakterienchromosoms die Genkarte des vegetativen Phagen (zyklisch permutiert) enthält. Bei diesem Prozeß spielen eine Rolle:

1. Am Integrationsprozeß unmittelbar beteiligte und im einzelnen noch unerforschte Sequenzen, sowohl im Phagen- wie im Bakterienchromosom und

2. eine dem Cistron int A entsprechende Integrase, ein Enzym, das auch in trans-Stellung seines Cistrons wirken kann, d.h. in Mischinfektion auch solchen Phagen zur Integration verhelfen kann, die es nicht selbst herstellen (20,21,22,48). Außer zur Integration ist das int A Produkt auch zur Excision des Prophagen nach Induktion erforderlich. Das int A Produkt steht ebenfalls unter negativer Kontrolle des Immunrepres-

sors, d.h. es kann nur vor Erreichen des reprimierten Zustandes synthetisiert werden. Die erwähnte Integrase ist ferner in der Lage, eine Rekombination zwischen der Integrationsstelle im Bakterienchromosom und einer eventuell vorhandenen, dazu passenden Integrationsstelle in einem Episom herbeizuführen (36,47). Weiterhin ist ihr Einfluß feststellbar auf eine in Phagenkreuzungen über die Integrationsstelle hinweg auftretende, zusätzliche Rekombination (17). Auch bezüglich der allgemeinen, in Lambda-Kreuzungen beobachteten genetischen Rekombination ist heute klar, daß sie eines enzymatischen Systems bedarf, das entweder von der Wirtszelle oder wirksamer vom Phagen selbst beigesteuert werden kann. Mit Hilfe von Mutanten verschiedener Cistren des eigenen Rekombinationssystems von Lambda (red) konnte gezeigt werden, daß bei Ausfall dieses Systems fast keine Rekombinanten in Lambda-Kreuzungen auftreten, wenn sie in rec^--Wirtszellen ausgeführt werden, d.h. in Zellen, in denen auch bakterielle Rekombination fehlt. Eine Ausnahme bildet nur die oben erwähnte, von int A abhängige spezielle Rekombination über die Integrationsstelle hinweg. Bei Ausführung der Kreuzungen in rec^+-Wirten ergeben sich Rekombinationswerte, die etwa 10 % der mit Lambda-Wildtyp erzielten betragen. Das Rekombinationssystem von Lambda steht ebenfalls unter negativer Kontrolle des Immunrepressors und unter positiver Kontrolle des Genprodukts N. Die oben erwähnte Lambda-spezifische Exonuclease ist inzwischen mit Hilfe einer temperatursensitiven Mutante als Bestandteil

dieses Rekombinationssystems erkannt worden (44).

Die genetische Beschreibung der Immunität verlangt, neben Lambda die sogenannten lambdoiden Phagen zu betrachten, die mit Lambda in ihren allgemeinen Eigenschaften verwandt sind. Die lambdoiden Phagen, z.B. 21, 82, 424, 434, Ø 80 sind unabhängig von Lambda isoliert worden, haben sich wie Lambda als lysogenisierende, UV-induzierbare Phagen erwiesen, die mit Lambda in etwa die Größe des Chromosoms und - soweit bekannt - exakt die Struktur der Enden des Chromosoms gemeinsam haben (2,57). Sie sind in der Lage, wenn auch in quantitativ sehr unterschiedlichem Maße, mit Lambda und untereinander genetisch zu rekombinieren. Ausgenommen ist für jeden dieser Phagen ein bestimmtes Gebiet um die Region der C_I-Mutanten, die sogenannte Immunitäts- oder Nichthomologieregion des betreffenden Phagen (31). In diesem Bereich sind nur Rekombinationen mit Phagen des gleichen Immunitätstyps möglich. Diese Immunitätstypen sind funktionell dadurch gekennzeichnet, daß jeder Typ nur der Kontrolle des von ihm selbst hergestellten Immunrepressors unterworfen ist, nicht dagegen der von Immunrepressoren, die von Phagen anderer Typen produziert werden. Die voneinander verschiedenen Typen werden als heteroimmun bezeichnet. Ein lambdoider Phage kann also auf dem Lysogen eines heteroimmunen Phagen wie auf einem sensitiven Wirt Plaques bilden.

Die Nichthomologieregion beherbergt sowohl die Strukturinformation wie auch spezifische Angriffspunkte des

Immunrepressors. Es sind Operator-Mutanten bekannt, die die Ablesung des Gens O bzw. N jedenfalls teilweise der Kontrolle des Repressors entziehen (43). Tritt eine Kombination dieser beiden Operatormutanten mit einer geeigneten C_I-Mutante zusammen, so entsteht ein virulenter Phage, der nicht nur auf den Lysogenen heteroimmuner, sondern auch homoimmuner Phagen Plaques zu bilden vermag. Die Erscheinung der Virulenz ist im einzelnen noch sehr wenig geklärt. Nicht nur die Immunität, sondern auch die spezifische Integrationsstelle im Bakterienchromosom ist für die einzelnen lambdoiden Phagen verschieden. Entgegen früheren Annahmen besteht aber keine feste Beziehung zwischen dem Integrationssystem und der Immunität. Diese lassen sich durch Rekombination voneinander trennen (36,45).

3) Biochemische Ergebnisse zur Lambda-Genetik

Auf verschiedene im Zusammenhang mit der Genetik durchgeführte biophysikalische und biochemische Untersuchungen wurde oben bei der Betrachtung der Phagenspezifischen Enzyme Exonuclease und Lysozym, bei der Darstellung der elektronenmikroskopischen Befunde zur Morphogenese von Lambda und insbesondere bei der Erörterung der Bedingungen für Lambda-DNS-Synthese z.T. schon hingewiesen. Die Technik der DNS-RNS-Hybridisierung in Verbindung mit der präparativen Trennung rechter und linker Hälften in der Mitte gebrochener Lambda-Chromosomen und insbesondere der Trennung der komplementären Stränge des Phagen Lambda haben es

darüberhinaus ermöglicht, über die grundlegenden Gegebenheiten der Transskription von Lambda und ihre Kontrolle Aufschluß zu erhalten (49,52). Danach wird im lysogenen Zustand nur die der C_I-Region entsprechende messenger RNS gebildet und zwar von rechts nach links am 5'G Strang. Nach Induktion oder nach Infektion wird primär, ohne daß Proteinsynthese vorausgegangen sein müßte, auf dem gleichen Strang in der gleichen Richtung RNS synthetisiert, die den Funktionen N bis int A entspricht. Auf dem Gegenstrang wird in entgegengesetzter Richtung RNS, die den Funktionen O und P entsprechen müßte, synthetisiert. Erst danach und nachdem Proteinsynthese stattgefunden hat, wird auf diesem 5'A Strang weitere messenger RNS synthetisiert. Etwa 20 Minuten nach Beginn des vegetativen Zyklus beginnt die Transskription eines weiteren ausgedehnten Bereiches auf dem 5'A Strang, in dem die Gene der späteren Funktionen liegen.

4) Kaltsensitive Mutanten als Mittel zur weiteren Analyse des Lambda Systems

Aus dem oben entwickelten Bild der Vorgänge im vegetativen Zyklus von Lambda läßt sich die Vermutung ableiten, daß die einzelnen Genprodukte sehr verschiedenen Anforderungen an mögliche Konformationsänderungen und Regelbarkeit unterworfen sind, da sie sehr verschiedenen Zwecken dienen:

nämlich
der Initiation von DNS-Synthese;
der Morphogenese in unmittelbarer Wechselwirkung mit der Phagen-DNS;
der Morphogenese ohne unmittelbare Wechselwirkung mit der Phagen-DNS;
als Komponenten des Rekombinationssystems, die vielleicht in eine bestimmte Strukturbeziehung zur DNS treten müssen;
als Enzyme, wie z.B. Lysozym, ohne erkennbare Beziehung zu den Komponenten des Virus.

Allgemein gesprochen, wird man damit rechnen dürfen, daß manche Proteine eine Versteifung ihrer Struktur durch Mutation ohne wesentliche Einbuße ihrer Funktion ertragen, andere dagegen nicht. Eine bisher wenig beachtete Gruppe von bedingt letalen Mutanten, die kaltsensitiven, scheint nach einem wohl analysierten Beispiel (39) (Histidin auxotrophe von E.coli, s. unten), die Aussicht zu bieten, diese Gruppen von Proteinen wenigstens heuristisch unterscheiden zu können. In diesem Sinne wurden im Verlauf der vorliegenden Arbeit zunächst kaltsensitive Mutanten des Bakteriophagen Lambda gesucht und die gefundenen in Bezug auf ihre genetische Lage und ihre phänotypischen Eigenschaften analysiert.

5) Kaltsensitive Mutanten bei E.coli, T4, T1 und ØX-174

Ehe auf die eigenen Untersuchungen eingegangen wird, seien kurz die bei anderen Systemen durchgeführten Untersuchungen an kaltsensitiven Mutanten erwähnt. Unter den von E.coli isolierten kaltsensitiven Mutanten wurden insbesondere solche untersucht, die bei 20° C Histidin-auxotroph geworden waren, d.h. bei dieser Temperatur in Abwesenheit von Histidin nicht wachsen können. In Anwesenheit von Histidin ist ihre Wachstumsrate gleich der des Ausgangsstammes. Von diesen Stämmen wurde das Enzym Phosphoribosyl-ATP-Pyrophosphorylase, das bei der Biosynthese des Histidins eine Rolle spielt, isoliert und auf seine Hemmbarkeit durch Histidin geprüft (39). Diese erwies sich auch bei 37° C als außerordentlich hoch. Der ursächliche Zusammenhang zwischen dem regulatorischen Enzymdefekt einerseits und dem kaltsensitiven Charakter des Bakteriums andererseits wurde dadurch erwiesen, daß alle Revertanten zu nichtkaltsensitivem Charakter gleichzeitig diese Besonderheit des Enzyms verloren hatten.

Vom Phagen T4 wurden bei einer systematischen Suche nach temperatursensitiven Mutanten auch kaltsensitive gefunden, aber nicht näher untersucht (18).

Vom Phagen T1 sind mehrere Stämme, wahrscheinlich gleichen Ursprungs, vorhanden, von denen der sogenannte Wildtyp bei 18° C Plaques bildet, andere da-

gegen nicht. Wie aus Kreuzungen mit dem Wildtyp hervorgeht, ist der kaltsensitive Charakter dieser Stämme durch einen bestimmten genetischen Locus bedingt. Kaltsensitive Mutanten wurden, vom Wildtyp ausgehend, nicht isoliert, wohl aber Mutanten der kaltsensitiven Stämme, die den kaltsensitiven Charakter verloren hatten.

In Mischinfektion erweist sich der nichtkaltsensitive Charakter nur als teilweise dominant (12).

Auch von dem kleinen einzelsträngigen DNS-Phagen ØX-174 wurden kaltsensitive Mutanten selektiert (16). Die Autoren finden bei allen ihren kaltsensitiven Mutanten eine höhere Reversionsrate als bei Sus- oder temperatursensitiven Mutanten. Die vorhandenen kaltsensitiven Mutanten bilden zwei Klassen, solche die in einem Strukturprotein des Phagen betroffen und nicht in der Lage sind, bei niedriger Temperatur eine Infektion einzuleiten, und solche, bei denen sich der kaltsensitive Defekt später im Verlauf des Infektionszyklus bemerkbar macht.

II. EXPERIMENTELLER TEIL

1) Material und Methoden

Bakterien und Bakteriophagen

Siehe Tabelle 1a und 1b.

Aufbewahrung der Bakterienstämme und Phagenlysate

Bakterienstämme wurden auf sterilen Schrägagarröhrchen - Zusammensetzung des Agars siehe Tryptonagarplatten - angeimpft, 16 Stunden bei 37° C inkubiert und bei 4° C aufbewahrt. Überimpfung wurde im Abstand von 2 Monaten ausgeführt.
Phagenlysate wurden mit Chloroform sterilisiert und bei 4° C aufgehoben.

Medien

Tryptonbrühe:

10 g Bacto-Tryptone, 8,0 NaCl in 1000 ml aqua dest. 15 Minuten bei 120° C autoklaviert.

Tryptonagarplatten:

10 g Bacto-Tryptone, 10 g Bacto-Agar, 8,0 g NaCl in 1000 ml aqua dest. 15 Minuten bei 120° C autoklaviert und je 25 ml in sterile Plastikschalen (10 cm Ø) gegeben.

Weichagar:

10 g Bacto-Tryptone, 7,5 g Bacto-Agar, 8,0 g NaCl in 1000 ml aqua dest. 15 Minuten bei 120° C autoklaviert (zur Überschichtung).

Puffer - TRIS-Mg:

10^{-2} molar $MgCl_2$ und 10^{-2} molar TRIS-HCl, pH 7,1.

Infektionsmedium:

10^{-2} molar TRIS-HCl Puffer, pH 7,1, 6×10^{-5} molar $MgCl_2$, 5×10^{-4} molar $(NH_4)_2SO_4$ und 4×10^{-10} molar $FeSO_4$.

Ultraviolettlampe:

Osram HNS ofr.

Mutagen:

N-Methyl-N-Nitroso-N'-Nitroguanidin (NNG) von Koch-Light Laboratories Ltd., Colnbrook, Buckinghamshire, England.

Das Ausgangsmaterial wurde von folgenden Firmen bezogen:

Bacto-Tryptone	-	Difco Laboratories, Detroit 1, Michigan/USA
Bacto-Agar	-	" "
NaCl (pro analysi)	-	E. Merck AG, Darmstadt
$MgCl_2$ (pro analysi)	-	" "
$(NH_4)_2SO_4$ (pro analysi)	-	" "
$FeSO_4$ (pro analysi)	-	" "
Maltose (für Mikroskopie u. Bakteriologie)	-	" "
Saccharose (Ampullen-qualität)	-	" "
Chloroform (pro analysi)	-	" "
TRIS(hydroxymethyl)-amino-methan	-	" "
Plastikschalen	-	Urbanti, S. u. K. Dawe, Bottrop

Methoden

Alle speziellen Methoden sind bei der Beschreibung der entsprechenden Experimente im Text dargestellt. Im übrigen entsprechen die allgemeinen Methoden den bei der Arbeit mit Bakteriophagen üblichen:

Verdünnungen:

Verdünnungen von Phagen- und Bakteriensuspensionen wurden in sterilem TRIS-Mg Puffer ausgeführt.

Inkubation:

Inkubationen bei 37° C und 42° C wurden in Wassermantelinkubatoren (Bergmann, Berlin) mit einer Temperaturkonstanz von ± 0,1° C ausgeführt, Inkubationen bei 29° C bzw. 30° C in einem Gerät mit Luftumwälzung (Physikal. Werkstätten, Göttingen). Die Temperatur des letzten wurde durch an verschiedenen Stellen angebrachte Thermometer kontrolliert und ebenfalls auf ± 0,1° C genau gehalten. In allen Inkubatoren wurde für ausreichende Feuchtigkeit (offene Wasseroberfläche) gesorgt.

Plattierung:

Die Indikatorbakterien, 0,2 ml einer frischen Übernachtkultur in Tryptonbrühe, wurden zu 2,0 ml Weichagar bei 45° C gegeben und zu dieser Mischung nach spätestens 5 Minuten die Phagenprobe. Unmittelbar danach wurde die gesamte Mischung auf eine Tryptonagarplatte ausgegossen. Nach Erstarrung der aufgegossenen Schicht wurden die Platten steril abgedeckt

und in die jeweiligen Inkubatoren eingelegt.

Isolation und Replikation von Bakterienkolonien:

Zur Isolierung von Einzelkolonien wurden geeignete Verdünnungen von Bakteriensuspensionen auf Tryptonagarplatten verstrichen und diese bei 29° C oder 37° C inkubiert.

Abstempeln: Die Oberfläche der abzustempelnden Platten wurde leicht auf ein über einen Metallblock gespanntes steriles Samttuch gedrückt. Anschließend wurde die Platte, die das Stempelbild erhalten sollte, ebenso auf dasselbe Samttuch gedrückt.

2) Isolierung kaltsensitiver Mutanten von Lambda und 434hy

Der Versuch der Isolierung kaltsensitiver Mutanten nahm seinen Ausgang von Lambda Wildtyp bzw. dem heteroimmunen Phagen 434hy. Zunächst wurde die untere Grenze des Temperaturbereiches festgestellt, in dem diese Phagen auf den verwendeten Wirtsstämmen Plaques bilden, nämlich auf C600, W3110, W3350, Hfr43 und, im Falle der von Lambda abgeleiteten Mutanten, auf W3101 (434hy). Nach 16stündiger Inkubation bei 29° C ergeben sich etwas verkleinerte aber zuverlässig erkennbare Plaques mit einer Plattierungswahrscheinlichkeit von 1, d.h. in gleicher Anzahl wie auf Platten, die bei 37° C bebrütet wurden. Diese Plaques können in trübe und klare unterteilt werden, d.h. der lysogenisierende bzw. nichtlysogenisierende Charakter ist an den

Plaques feststellbar. Der Wildtyp führt auch bei 25° C noch zur Plaquebildung, allerdings erst im Verlauf von 48 Stunden unter Bildung derart kleiner Plaques, daß sie

1. nicht mehr zuverlässig gezählt werden können,
2. die Plattierungswahrscheinlichkeit deutlich unter 1 liegt,

   und
3. eine Feststellung des Plaquetyps nicht mehr möglich erscheint.

Bei 29° C vereinzelt auftretende größere Plaques gaben Anlaß zu der Untersuchung, ob es sich hier um kaltresistente Mutanten handeln könnte, d.h. Mutanten, die bei 29° C größere Plaques und möglicherweise bei niederen Temperaturen noch zuverlässig Plaques bilden würden. Keine dieser größeren Plaques enthielten eine vom Wildtyp erkennbar verschiedene Nachkommenschaft. Der Versuch, in mutagenisierten Phagenlysaten (Beschreibung s. unten) kaltresistente Mutanten aufzufinden, schlug ebenfalls fehl. Sollten derartige Mutanten existieren, so macht ihr Anteil höchstens 0,06 % aus, in Lysaten, in denen Klarmutanten (C_I, C_{II}, C_{III}) sich bis zu 10 % angesammelt hatten.

Aus den oben erwähnten Gründen wurden 29° C als Selektionstemperatur für etwaige kaltsensitive Mutanten gewählt. Ein direktes Selektionsverfahren für kaltsensitive Mutanten ist nicht ersichtlich. Der Versuch, ausgehend von der C_I-Mutante C_{30}, kaltsensitive Mutanten an besonders kleinen oder trüben Plaques zu entdecken auf Platten, die für begrenzte

Zeiten bei 37° C, anschließend bei 29° C inkubiert worden waren, blieb ergebnislos. Daher wurde der Weg beschritten, ausgehend von einem in hohem Maße mutagenisierten Lysat, Lysogene bilden zu lassen und diese in einem sicher zu handhabenden Verfahren auf das Vorhandensein kaltsensitiver Prophagen zu prüfen. Die Mutagenisierung mit dem hochwirksamen Mutagen N-Methyl-N-Nitroso-N'-Nitroguanidin (NNG) wurde in Anlehnung an bekannte Verfahren folgendermaßen ausgeführt (1,22): Zu einer exponentiell wachsenden Kultur von Escherichia coli C600 in Tryptonbrühe plus 1 % Maltose werden bei einem Bakterienzelltiter von etwa 4 x 10^8/ml Lambda Wildtyp bzw. 434hy-Phagen mit einer Multiplizität der Infektion von 0,5 zugegeben. Zur Adsorption der Phagen, die an in Gegenwart von Maltose gewachsenen Zellen besonders gut ist, wird die Mischung 15 Minuten bei 37° C ohne Belüftung inkubiert; anschließend wird NNG mit einer Endkonzentration von 40 µg/ml zugegeben. Sofort nach Zugabe wird die Kultur vorsichtig bei 37° C 10 Minuten belüftet, anschließend eine 1000fache Verdünnung in Tryptonbrühe plus 1 % Maltose hergestellt und diese Verdünnung 90 Minuten bei 37° C belüftet. Zur Sterilisierung des entstandenen Lysats wird dieses mit 1/20 Volumen Chloroform versetzt. Ein solches Lysat enthält einen außerordentlich hohen Anteil an Mutanten: die unmittelbar erkennbaren Klarmutanten sind bis zu 10 % vertreten. Die Behandlung des Lambda-Genoms mit NNG im Prophagenzustand hätte sehr viel geringere Mutationshäufigkeiten für alle Gene ergeben. Zahlreiche unabhängig

voneinander mit NNG behandelte Lysate wurden jeweils auf eine mit ca 2 x 10^8 Bakterien C600 eingesäte Platte aufgetropft. Nach 12stündiger Inkubation bei 37° C ist an der Auftropfstelle ein Rasen lysogener Bakterien entstanden. Aus diesem werden eine große Zahl Einzelkolonien isoliert und durch Abstempeln auf mit C600 dicht eingesäte Agarplatten auf lysogenen Charakter geprüft. Aufgrund der durch lysogene Kolonien spontan freigesetzten Phagen werden diese Kolonien auf dem Abdruck durch die sich bildenden Lysis-Ringe erkennbar. Dies gilt zunächst für die Inkubation dieser abgestempelten Platten bei 37° C. Lysogene kaltsensitiver Phagen geben sich dadurch zu erkennen, daß der entsprechende Abdruck bei 29° C inkubiert, zu keinem Lysis-Ring führt. Lysogene, die auf diese Weise als Träger kaltsensitiver Phagen verdächtig sind, werden reisoliert und in gleicher Weise überprüft. Unter 50.000 geprüften Kolonien wurden auf diese Weise 30 kaltsensitive Lysogene gefunden. Die von ihnen produzierten Phagen erwiesen sich alle als kaltsensitiv in dem Sinne, daß die Plattierungswahrscheinlichkeit auf C600 bei 29° C wesentlich kleiner als 1 ist, und zwar bei 13 schwach kaltsensitiven Mutanten zwischen 1 x 10^{-2} und 7,6 x 10^{-2}, bei 17 anderen Mutanten höchstens 1,4 x 10^{-3}, in manchen Fällen wesentlich niedriger (Tabellen 2 und 2a). Die 13 schwach kaltsensitiven Mutanten wurden von der weiteren Untersuchung ausgeschlossen, da die Höhe der bei ihnen noch vorhandenen Plattierungswahrscheinlichkeit bei 29° C (auf C600) ihre Kartierung

mit der erforderlichen Genauigkeit und insbesondere ihre Prüfung im Komplementierungstest zur Feststellung der betroffenen Funktionen nicht hoffnungsvoll erscheinen ließ. Bei allen in Tabelle 2 aufgeführten von Lambda abgeleiteten kaltsensitiven Mutanten wurden einige von den (seltenen) Plaques auf 29° C-Platten daraufhin geprüft, inwieweit die in ihnen enthaltenen Phagen noch kaltsensitiv waren. Dazu wurden gleiche Proben auf C600 plattiert und der Titer nach Inkubation bei 29° C bzw. 37° C verglichen. In fast allen Fällen stimmten diese Titer im Rahmen der Meßgenauigkeit überein, d.h. die Plaques enthielten überwiegend, wenn nicht ausschließlich, Revertanten zu nicht kaltsensitivem Charakter (C_s+) . Einige kaltsensitive Mutanten zeigten nach Inkubation bei 30° C Verhältnisse, wie sie etwa für den Wildtyp nach Inkubation bei 25° C charakteristisch sind, d.h. extrem kleine und nicht mit 100 % Wahrscheinlichkeit auftretende Plaques. Nach Inkubation bei 33° C ist kein Anzeichen der Kaltsensitivität mehr feststellbar; sämtliche Mutanten zeigen Plaques von der Größe und dem Typ, den sie auch bei 37° C-Inkubation aufweisen. Die Prüfung der Plattierungseigenschaften wurde für alle kaltsensitiven Mutanten auf C600, für die von Lambda abgeleiteten auch auf den Stämmen W3110, W3350, Hfr43 und W3101 (434hy) ausgeführt. Dabei ergaben sich keine Unterschiede bezüglich der Plattierungsbakterien außer im Falle der Mutante C_s2 (s. unten), die auf W3110 nicht kaltsensitiv ist.

Vor Besprechung der weiteren Kennzeichnung der erhaltenen Mutanten sei auf ein negatives Ergebnis hingewiesen:
Neben kaltsensitiven Mutanten im Sinne der vegetativen Phagenvermehrung sollten solche gesucht werden, bei denen die Funktion des Gens der Integrase (int A) kaltsensitiv ist. Nach dem in der Einleitung Gesagten müßte sich dies nicht nur bei dem Versuch der Lysogenisierung bei niedrigen Temperaturen, sondern auch bei der Phagen-Excision, d.h. der spontanen Induktion bei 29° C geltend machen. Um diese Möglichkeit in die Mutantensuche einzubeziehen, wurden alle bei der Isolierung der Lysogene aufwachsenden Kolonien bei 29° C herangezogen, so daß das erwähnte Stempelverfahren Integrase-kaltsensitive Lysogene hätte erkennen lassen sollen. Die tatsächlich gefundenen 30 Mutanten betreffen aber alle den vegetativen Zyklus von Lambda.

3) Kartierung der kaltsensitiven Mutanten

Die weitere Kennzeichnung der gewonnenen Mutanten durch genetische Kartierung und Komplementierungsversuche setzt voraus, daß sich sowohl die 'Leakyness' wie auch die Reversionsrate in gewissen Grenzen hält. Die Reversionsrate war in den meisten Fällen außerordentlich hoch (Tabelle 2, 2a), durchaus parallel zu den Feststellungen am System ØX-174 (16). Die gefundene hohe Reversionsrate kann zum Teil auf einen ungünstigen technischen Umstand zurückzuführen sein, daß nämlich eine gewisse 'leakyness' der Mutanten auch dann zur

Plaquebildung führen kann, wenn zwar nicht der ursprünglich plattierte Phage, wohl aber einer seiner unmittelbaren Nachkommen eine Revertante darstellt. Aber auch unter - soweit zu beurteilen - absolut permissiven Bedingungen (37° C, Größe der Plaques von Lambda Wildtyp nicht zu unterscheiden) ergeben sich bei Vermehrung der kaltsensitiven Mutanten durch Infektion in den entstehenden Lysaten immer so viele Revertanten, daß sie für weitere Untersuchungen kaum verwendbar sind. Glücklicherweise ist jedoch die Reversionsrate im Prophagenzustand viel geringer. Es empfiehlt sich daher, die kaltsensitiven Genome in Form der Lysogene zu vermehren. Diese Lysogene eignen sich zur Herstellung von phagenhaltigen Lysaten durch UV-Induktion in folgender Weise: Eine exponentiell wachsende Kultur des Lysogens in Tryptonbrühe, bei 37° C belüftet, mit einem Zelltiter von 4×10^8/ml wird zentrifugiert und im gleichen Volumen TRIS-Magnesium suspendiert. Die Resuspension wird mit einer für optimale Ausbeute geeichten Dosis UV-Licht (40 Sekunden Brenndauer der Osram HNS ofr-Lampe aus 40 cm Entfernung, Schichtdicke der Suspension 0,4 mm) bestrahlt, mit dem gleichen Volumen Tryptonbrühe versetzt und 2 Stunden bei 37° C intensiv belüftet. Nach dieser Zeit ist im allgemeinen eine Klärung der Kultur aufgrund von Zell-Lysis unmittelbar ersichtlich. Das Lysat wird mit Chloroform behandelt. Mit den im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Mutanten sind mit dieser Methode Titer zwischen 2×10^9 und 5×10^9/ml zu erreichen. Für jedes Lysat kaltsensitiver Phagen wurde durch Vergleich der Plaque-Zahlen bei

37° C und bei 29° C die Reversionsrate bestimmt (s. Tabelle 2). Die Reversionsrate ist für die jeweilige Mutante charakteristisch; sie läßt sich bei Herstellung neuer Lysate bis auf einen Faktor 2 reproduzieren.

Kreuzungen der 17 Mutanten untereinander und mit Sus-Mutanten wurden nach folgendem Schema durchgeführt: Eine Kultur von E.coli C600 in Tryptonbrühe bei 37° C exponentiell wachsend wurde bei einem Titer von 4×10^8 Zellen/ml zentrifugiert, in gleichem Volumen Infektionsmedium aufgenommen, 10 Minuten bei 37° C inkubiert, in Eis gekühlt und mit den für die Kreuzung vorgesehenen Phagen mit einer Multiplizität von jeweils 2 infiziert. Die Infektionsmischung wurde zur Adsorption der Phagen 10 Minuten bei 0° C belassen, zur Injektion der Phagen-DNS für 6 Minuten auf 37° C erwärmt, anschließend 2×10^3fach in Tryptonbrühe verdünnt und 2 Stunden bei 37° C belüftet. Das entstandene Lysat wurde mit Chloroform behandelt. Der Titer des Lysats wurde durch Plattierung auf C600 mit nachfolgender Inkubation bei 37° C festgestellt. Im Falle der Kreuzungen kaltsensitiver Mutanten untereinander wurden die Rekombinanten ebenfalls durch Plattierung auf C600 bestimmt. Hier wurde dann jedoch bei 29° C inkubiert. Im Falle der Kreuzungen zwischen kaltsensitiven und suppressorsensitiven Mutanten wurde bei 29° C auf dem nichtpermissiven Stamm W3350 selektiert. Entsprechend allgemeinen Erfahrungen bei Lambda-Kreuzungen ergibt sich eine nicht unbeträchtliche quantitative Variation zwischen einzelnen wieder-

holten Kreuzungen, so daß eine quantitative Angabe von Rekombinationsraten nur bei der Statistik über eine größere Anzahl von Kreuzungen im einzelnen gesichert wäre. Hierauf wurde insoweit verzichtet, als dadurch die erstrebten Schlußfolgerungen nicht beeinträchtigt wurden. Ein erster Einblick in die Verteilung der kaltsensitiven Mutanten auf der genetischen Karte von Lambda ergibt sich aus ihren Kreuzungen untereinander. Es findet sich eine Reihe von Gruppen derart, daß innerhalb einer Gruppe keine Rekombination, d.h. weniger als 0,005 % beobachtet wird, zwischen je zwei Gruppen dagegen mindestens eine Rekombinationsrate von 0,2 %. Diese Einteilung ist nur möglich auf der Grundlage eines jeweils sehr geringen Anteils an Revertanten im Lysat der Selbstkreuzung. Für mehrere Mutanten, nämlich für C_s2, C_s4, C_s5, C_s6, C_s8, C_s12, $C_{si}4_3$, $C_{si}4_5$, $C_{si}4_6$ sind diese Anteile auf ungeklärte Weise wesentlich niedriger als in den zur Kreuzung benutzten Ausgangslysaten. Die Mutanten C_s1, C_s3, C_s9, C_s10, $C_{si}4_{30}$ erfüllen wegen des höheren Selbstkreuzungswertes die Bedingungen dieser Einteilung nicht, werden aber - ebenso wie $C_{si}4_{10}$ - wegen ihrer vergleichsweise kleinen Rekombinationshäufigkeit mit Mutanten der Gruppe C_s7 - C_s16 - $C_{si}4_3$ dieser Gruppe zugeordnet (s. Spalte 6 in Tabelle 2 und Tabelle 3).

Der Versuch der Lokalisierung der kaltsensitiven Mutanten auf der bekannten Genkarte von Lambda geschah im wesentlichen durch Kreuzungen mit verfügbaren suppressorsensitiven Mutanten. Die Deutung dieser

Versuche ist in Spalte 4 von Tabelle 2 niedergelegt, die tatsächlichen Rekombinationswerte sind in Tabelle 4 angegeben. Bei den von Lambda abgeleiteten kaltsensitiven Mutanten wurde auch die Kreuzung mit 434hy ausgeführt. Rekombinanten zwischen der Immunitätsregion und der jeweiligen kaltsensitiven Mutante wurden durch Plattierung bei 29° C auf Stamm W3101 (434hy) bestimmt; das bedeutet gleichzeitig Selektion gegen kaltsensitive Phagen und gegen Phagen vom Immunitätstyp 434. Die Ergebnisse sind ebenfalls in Tabelle 4 angegeben. Außerdem zeigt Tabelle 4 für jede kaltsensitive Mutante als Kontrolle eine Selbstkreuzung, d.h. die Bestimmung der Reversionsrate unter Kreuzungsbedingungen. Selbstkreuzungen der Sus-Mutanten mit der Ausnahme von Sus A lieferten, auf W3350 bei 29° C geprüft, Revertantenhäufigkeiten von weniger als 10^{-5}. Sus A lieferte unerwarteterweise bei wiederholten Versuchen Werte über 1 %. Daher wurde Sus A nicht zur Kreuzung benutzt. Es sei darauf hingewiesen, daß die in Tabelle 4 verzeichneten Rekombinationswerte - ausgenommen die mit 434hy - für jede einzelne C_s-Mutante gleichzeitig und unter Verwendung von Bakterienproben aus der gleichen Kultur genommen wurden. Dadurch wird eine Quelle möglicher Variation ausgeschlossen.

4) Komplementierungsversuche kaltsensitiver Mutanten in vivo und in vitro

Durch die Kreuzungsergebnisse (Tabelle 4) ist die genetische Lage einer jeden kaltsensitiven Mutante in einen Bereich festgelegt, der nur wenige Cistren umfassen kann. Es sollte aber so weit als möglich die Zuordnung zu einem bestimmten Cistron erreicht werden. Der bei Sus-Mutanten ausgearbeitete Test (7) wurde versuchsweise auf die Komplementierung von kaltsensitiven mit Sus-Mutanten übertragen:

Eine Suspension, die von beiden Phagentypen jeweils mindestens 5 x 10^7/ml enthält, wird auf eine mit dem nichtpermissiven Wirt W3350 eingesäte Platte aufgetropft mit nachfolgender Inkubation der Platte bei 29° C (bei Campbell (7) bei 37° C). Die Komplementierung ist positiv, wenn ein Fleck bakterieller Lyse beobachtet wird, der in den Kontrollen (Tropfen der beiden Partner einzeln) fehlt. Ein eindeutiges Testergebnis konnte nur bei Verwendung der besten kaltsensitiven Mutanten C_s7 und C_s16 erhalten werden, während bei Verwendung anderer kaltsensitiver Mutanten die von den Revertanten gebildeten Plaques den Fleck zumindest teilweise überwuchsen. Für C_s7 und für C_s16 ergab sich Komplementierung mit allen benutzten, d.h. den in Tabelle 4 aufgeführten Sus-Mutanten außer mit Sus A. Dies steht im Einklang mit der durch die Kreuzungen ermittelten genetischen Lage von C_s7 und C_s16 und der Tatsache, daß sie untereinander keine Rekombination zeigen. Erwartungsgemäß ergab sich auch keine Komplementierung zwischen C_s7 und C_s16 nach der obigen Methode. Im Falle der anderen

kaltsensitiven Mutanten wurden in zahlreichen Versuchen mit verschiedenen Sus-Mutanten oft deutliche Anzeichen beträchtlicher Komplementierung beobachtet. Der wesentlich Punkt in diesem Zusammenhang ist aber, daß gerade dann, wenn keine Komplementierung vorliegt, dies sicher erkennbar sein muß.

Auf einem anderen Wege gelang es, die Frage nach der Komplementierung auch für verschiedene Paare kaltsensitiver Mutanten zu beantworten, bei denen der eben beschriebene Test erfolglos blieb. Es wurden Doppellysogene hergestellt für je eine kaltsensitive Mutante vom Immunitätstyp von Lambda und eine solche vom Immunitätstyp von 434. Der doppellysogene Charakter wurde festgestellt durch Lysis-Ringe, die entsprechende Einzelkolonien nach Abstempeln sowohl auf C600 (λ)-Platten als auch auf C600 (434hy)-Platten hervorrufen.

Kulturen der einzel-lysogenen und der doppel-lysogenen Stämme wurden, wie oben beschrieben, mit UV induziert. Anstelle der anschließenden Belüftung bei 37° C trat eine solche bei 29° C, die in etwa 3 Stunden Lysate entstehen läßt. Die Titer dieser Lysate sind in Tabelle 7 dargestellt. Für je ein Einzel-Lysogen der kaltsensitiven Mutanten ist das Verhältnis der Titer eines 29° C- und eines 37° C-Lysats in Tabelle 2, Spalte 3 angegeben. Hiernach läßt sich schon ohne Komplementierungsversuche feststellen, daß keine der vorliegenden kaltsensitiven Mutanten von Lambda diese Eigenschaft mangelnder Adsorption an die Wirtszelle oder fehlender Injektion ihrer DNS bei 29° C verdankt,

wie es bei einer Gruppe kaltsensitiver Mutanten von ØX-174 beobachtet wurde (16). In einem solchen Falle sollte nämlich das Titerverhältnis der durch Induktion erzeugten Lysate für die betreffende Mutante und den Wildtyp das gleiche sein. In Tabelle 2, Spalte 3, findet sich kein solcher Fall. Aus diesen Daten wird aber deutlich, daß die Kaltsensitivität der vorliegenden Mutanten bei Betrachtung der Plaquebildung bei 29° C meist schärfer ausgeprägt ist als bei Betrachtung der Titer bei 29° C mit UV-Induktion hergestellter Lysate. Es muß angemerkt werden, daß zwischen dem in Tabelle 2, Spalte 3, wiedergegebenen Experiment und entsprechenden Daten in Tabelle 7 quantitative Unterschiede bestehen. Besonders für die C_s-Mutanten, aber auch für Lambda Wild-Lysogene sind die Werte in Tabelle 7 niedriger. Der Unterschied kann auf geringfügigen, schwer kontrollierbaren Schwankungen in den Versuchsbedingungen beruhen. Komplementierungsversuche und ihre Kontrollen wurden stets zusammen ausgeführt.

Komplementierung zwischen den in einem Doppellysogen vertretenen, kaltsensitiven Mutanten liegt vor, wenn das Lysat des Doppellysogens einen wesentlich höheren Titer aufweist als die Lysate der entsprechenden Einzellysogene. Wie aus Tabelle 7 hervorgeht, findet sich Komplementierung dort, wo sie aufgrund der Lage der Mutanten auf der Karte von Lambda vermutet wird, z.B. zwischen $C_{si}4_3$ und C_s8. Daß es sich in diesen und allen anderen in Tabelle 7 mit + bezeichneten Fällen wirklich um Komplementierung handelt und nicht um eine Folge höherer Rekombinationsraten, wird da-

durch gesichert, daß in allen entsprechenden 29° C-Lysaten mindestens 99 % der Phagen kaltsensitiv waren.

C_s1, C_s3, C_s5, C_s7, C_s9, C_s10 und C_s16 komplementieren nicht mit $C_{si}4_3$ und $C_{si}4_{10}$. Demnach gehören alle diese Mutanten einer Komplementierungsgruppe an, die dem durch Sus A definierten Cistron von Lambda gleichzusetzen ist.

Mit der oben beschriebenen Methode gelingt auch die Zuordnung der übrigen kaltsensitiven Mutanten zu bestimmten Cistren, nämlich von C_s2, C_s12, $C_{si}4_5$ und $C_{si}4_6$ zu Cistron G, von C_s6, C_s8 und $C_{si}4_{30}$ zu Cistron J und von C_s4 zu Cistron N (Tabelle 7). Dabei wurden jeweils auch Doppellysogene der kaltsensitiven Mutanten vom Immunitätstyp 434 mit den in Frage kommenden Sus-Mutanten von Lambda eingesetzt. Im Falle von C_s4 wurden auch Doppellysogene mit verschiedenen Lambda-Sus N-Mutanten geprüft. Diese homoimmunen Doppellysogene wurden wie die heteroimmunen hergestellt. Kolonien von Doppellysogenen wurden isoliert aufgrund folgender Eigenschaften:
Im Gegensatz zu C_s4-Einzellysogenen ergeben sich auch nach Abstempeln auf C600 und Inkubation bei 42° C Lysis-Ringe, im Gegensatz zu Sus N_7-Einzellysogenen ebenfalls nach Abstempeln auf W3350 und Inkubation bei 37° C. Daß auf diese Weise wirklich Doppellysogene (C_s4, Sus N) und nicht Einzellysogene für Wildtyp-Rekombinanten isoliert wurden, ergibt sich aus dem niedrigen Titer der 29° C-Lysate.

Im Falle der Doppellysogene, bei denen keine Komplementierung auftritt, liegt der Titer der 29° C-Lysate im allgemeinen zwischen den Titern der entsprechenden Lysate der zugehörigen Einzellysogene; wo dies zutrifft, liegt also keine Dominanz der schwächer kaltsensitiven Mutante vor. Es sind dabei im Lysat des Doppellysogens oft Phagen des einen Immunitätstyps häufiger, solche des anderen seltener als im Lysat des zugehörigen Einzellysogens. Die Titer beider Immunitätstypen sind zwar in vielen der Lysate aus Doppellysogenen annähernd gleich, in einigen aber deutlich verschieden. Ein Zusammenhang dieser Unsymmetrie mit dem Charakter der einzelnen kaltsensitiven Mutanten ist unwahrscheinlich, weil bei 37° C erzeugte Lysate jeweils annähernd die gleiche relative Häufigkeit der beiden Immunitätstypen aufweisen wie die bei 29° C erzeugten (Tabelle 7,2. Abschnitt). Möglich ist andererseits, daß die (unbekannte) Anordnung der beiden Prophagen in den benutzten Doppellysogenen die erwähnte Unsymmetrie beeinflußt.

Nach den erwähnten Rekombinations- und Komplementierungsdaten konnte vermutet werden, daß eine Reihe von kaltsensitiven Mutanten die Kopfbildung, andere die Schwanzbildung des Phagen beeinflußt. Eine solche Vermutung kann nach Weigle (55) direkt durch einen in vitro-Komplementierungstest geprüft werden. Für diesen Test wird aus je einem Lysogen der zu prüfenden Mutanten (bei Sus-Mutanten in einem pm^--Wirt) durch UV-Induktion ein Lysat erzeugt. Infolge einer Störung in der Bildung von Phagenköpfen bzw. Phagenschwänzen enthält jedes

Lysat keine oder sehr wenige infektiöse Phagen. Ein Lysat einer die Schwanzbildung betreffenden Mutante enthält aber intakte DNS-gefüllte Köpfe, ein Lysat einer die Kopfbildung betreffenden Mutante intakte Schwänze. Werden Proben solcher Lysate miteinander gemischt und inkubiert, ergibt sich eine wesentliche Steigerung des Phagentiters nur dann, wenn das eine Lysat das einer Kopfgenmutante, das andere das einer Schwanzgenmutante ist.

Mit geringeren technischen Abweichungen und quantitativ gleichem Ergebnis wurde der Weigle'sche Test in der vorliegenden Arbeit angewandt auf die Lysogene W3110 (λ Sus B_1) als Schwanzdonor und W3110 (λ Sus J_6) als Kopfdonor. Die Lysate wurden wie vorher beschrieben, nach UV-Induktion bei 37° C gewonnen. Das W3110 (λ Sus B_1)-Lysat wies einen Phagentiter von 1×10^3/ml auf, das W3110 (λ Sus J_6)-Lysat einen solchen von $9{,}0 \times 10^2$/ml. Mischung der Lysate im Verhältnis 1 : 1 ergab nach einstündiger Inkubation bei Zimmertemperatur einen Titer von 5×10^5/ml.

Zur Übertragung dieses Verfahrens auf die Komplementierung kaltsensitiver und suppressorsensitiver Mutanten gegeneinander war es notwendig zu prüfen, ob bei 29° C hergestellte Lysate kaltsensitiver Mutanten hinreichend frei von infektiösen Partikeln waren, um den Anstieg des Titers (bestimmt auf C600 bei 37° C) durch die erwähnte Komplementierung noch erkennen zu lassen. Dies war nur bei je einem Lysat von C_s7 und C_s16 mit Titern von $3{,}8 \times 10^3$ und

$1{,}2 \times 10^4$ infektiöser Phagen/ml der Fall. Die Komplementierungsversuche mit dem erwähnten W3110 (λ Sus B_1)-Lysat ergaben Titer von $5{,}4 \times 10^3$ bzw. $2{,}0 \times 10^4$/ml, die Komplementierungsversuche mit dem erwähnten W3110 (λ Sus J_6)-Lysat Titer von $5{,}0 \times 10^6$ bzw. $4{,}3 \times 10^6$/ml, d.h. Komplementierung mit der Kopfdonor-Mutante Sus J_6 aber nicht mit der Schwanzdonor-Mutante Sus B_1. Damit sind C_s7 und C_s16 definitiv als die Kopfbildung betreffende Mutanten nachgewiesen.

Schwieriger gestaltet sich der entsprechende Nachweis bei den vermutlich in der Schwanzbildung betroffenen kaltsensitiven Mutanten. Bei C_s8, der Schwanzmutante mit dem geringsten Phagentiter in dem bei 29° C hergestellten Lysat, war bei einem Titer von $2{,}0 \times 10^5$/ml eine Komplementierung nicht sicher nachzuweisen. Wieder in Anlehnung an Weigle wurde das Verfahren folgendermaßen verfeinert:
In Lysaten von Lambda Wildtyp-Lysogenen befinden sich außer infektiösen Phagen auch Schwänze, die im Überschuß produziert sind. Diese lassen sich mit Hilfe eines Saccharosegradienten von Köpfen und infektiösen Phagen trennen. In dem folgenden Versuch wurde nachgewiesen, daß ein bei 29° C - wie oben beschrieben - erzeugtes Lysat des Lambda-Wildtyps noch einen solchen Schwanzüberschuß aufweist, daß er zur Komplementierung des Sus J-Lysats dienen kann; ein ebenso erzeugtes Lysat von C_s8 dagegen nicht. Es wurden 0,25 ml des jeweiligen Lysats auf einen 5 bis 20 %igen Saccharosegradienten in 5 ml 0,07 M Phosphatpuffer (pH 7) aufgeschichtet. Der Gradient wurde im Spinco-SW-39-Rotor

bei 20° C 80 Minuten bei 37.000 U/Min. zentrifugiert. Unter diesen Bedingungen sollen infektiöse Phagen und Phagenköpfe vollständig sedimentiert sein, die Schwanzfraktion soll sich dagegen etwa in der Mitte des Gradienten befinden. Der Gradient wurde in 2-Tropfen-Fraktionen auf je 0,2 ml des W3110 (λ Sus J_6)-Lysats verteilt. Nach 60 Minuten Inkubation bei Zimmertemperatur wurden diese Mischfraktionen auf das Vorhandensein von infektiösen Phagen geprüft. Das Resultat, wiedergegeben in Abbildung 2, läßt die fehlende Komplementierung seitens freier Schwänze aus dem C_s8-Lysat erkennen.

5) Mutanten, die gleichzeitig kaltsensitiv und temperatursensitiv, bzw. suppressorsensitiv sind

Von den ursprünglich isolierten 149 suppressorsensitiven Mutanten sind 19 gleichzeitig im permissiven Wirt temperatursensitiv (7). Die in vorliegender Arbeit benutzten Sus-Mutanten wurden auf ihr Plattierungsverhalten auf C600 bei 29° C geprüft und teilweise als kaltsensitiv erkannt. Dabei scheint der C_s-Charakter fest an den Sus-Charakter gebunden zu sein, denn die sehr geringe Reversionsrate zu C_s^+ ist praktisch gleich der Reversionsrate zu Sus^+ und die geprüften C_s^+-Revertanten erwiesen sich alle als Sus^+ (s. Tabelle 5). Umgekehrt ist keine der 30 isolierten kaltsensitiven Mutanten suppressorsensitiv, obgleich infolge der Isolierung im permissiven Wirt solche kaltsensitiv-suppressorsensitiven Mutanten

hätten gefunden werden können. Dagegen erwiesen sich mehrere der kaltsensitiven Mutanten gleichzeitig als temperatursensitiv, insofern als sie bei 42° C auf W3110 keine Plaques bildeten (s. Tabelle 2,6). Von den temperatursensitiven Mutanten $C_{si}4_3$, $C_{si}4_5$, $C_{si}4_6$, C_s2, C_s4 und C_s8 wurden Revertanten bei 42° C und bei 29° C selektiert und jeweils auf temperatursensitiven und kaltsensitiven Charakter geprüft. Bei allen 6 Mutanten finden sich Revertanten, bei denen der kaltsensitive und temperatursensitive Charakter zugleich beseitigt ist, die also C_s^+ und t_s^+ sind. Das zeigt für jede der 6 Mutanten, daß der kaltsensitive und der temperatursensitive Charakter auf dieselbe Mutation zurückgehen und nicht auf das zufällige Zusammentreffen einer C_s-Mutation und einer t_s-Mutation in dem Phagen. Es finden sich aber bei C_s8, $C_{si}4_3$, $C_{si}4_5$ und $C_{si}4_6$ auch Revertanten, bei denen entweder der temperatursensitive oder der kaltsensitive Charakter ganz oder teilweise erhalten ist. Solche Revertanten entstehen nicht aufgrund echter Rückmutationen, sondern aufgrund von Suppressormutationen (Tabelle 6).

6) Besonderheiten einzelner kaltsensitiver Mutanten

C_s1:

Während von allen anderen kaltsensitiven Mutanten C_I-Mutanten unter Erhaltung der kaltsensitiven Eigenschaft isoliert wurden, gelang dies von C_s1 nicht. 30 unabhängig voneinander isolierte C_I-Mutanten er-

wiesen sich alle als nicht kaltsensitiv. Der C_I-Charakter dieser Mutanten war nach ihrem Plaquetyp und nach der Häufigkeit, mit der sie insgesamt aufgetreten waren, von vornherein zu vermuten. Bestätigt wurde er dadurch, daß keine von ihnen die C_I-Mutante C_{30} bei Lysogenisierungsversuchen komplementiert, die 10 daraufhin getesteten aber sowohl die C_{II}-Mutante CO_1, wie auch die C_{III}-Mutante C_{67} (30). Der Test bestand darin, daß nach Linien intensiven Bakterienwuchses im Gebiet der Überlappung von Plaques beider Testpartner als Zeichen von Komplementierung gesucht wurde. Es sei hervorgehoben, daß die von diesen C_I-Mutanten bei 29° C gebildeten Plaques in ihrer Größe nicht verschieden sind von den bei 29° C gebildeten Plaques des Lambda Wildtyps oder authentischer Lambda C_I-Mutanten, und deutlich größer als die kleinsten erkennbaren. Zwar läßt die hohe Reversionsrate von C_s1 vermuten, daß es sich um eine verhältnismäßig schwach kaltsensitive Mutante handelt, aber von einer Reihe der nach diesem Kriterium nicht stärker kaltsensitiven Mutanten war die Isolierung kaltsensitiver C_s1 ohne weiteres möglich. Daher dürfte es sich um einen qualitativen Effekt handeln und nicht um einen quantitativen in dem Sinne, daß Ansätze zu Plaques bei C_s1 selbst unsichtbar bleiben, dagegen bei allen davon abgeleiteten C_I infolge einer geringfügig angehobenen Wurfgröße über die Schwelle zur Sichtbarkeit hinaus wachsen.

C_s2:

C_s2 zeichnet sich - wie in Tabelle 4 belegt - durch

eine insgesamt abnorm kleine Rekombinationsrate mit allen Sus-Mutanten aus. Gleichzeitig fällt das Fehlen des kaltsensitiven Charakters auf Stamm W3110 auf. Auf dem von W3110 abgeleiteten Stamm W3350 ist C_s2 dagegen kaltsensitiv, ebenso auf C600 und W3101 (434hy).

C_s4:

C_s4 liegt, nach der geringen Rekombinationshäufigkeit in Kreuzungen mit Sus N_7 und 434hy zu schließen, in der Nähe des Gens N bzw. der Immunitätsregion. Da die Bestimmung der genauen Lage von C_s4 von theoretischem Interesse sein könnte, wurden die vorhandenen Möglichkeiten zur Kartierung ausgeschöpft.

Die Kreuzungsergebnisse sind in Tabelle 8 dargestellt. Die bei diesen Kreuzungen benutzte Mutante clC_s4 ist von C_s4 isoliert und durch Komplementierung mit C_{30}, CO_1 und C_{67} wie oben beschrieben als C_I charakterisiert. Die Reihenfolge der Bezugsmarker auf der genetischen Karte ist:

Sus N_7-(clC_s4-C_{30} oder C_{30}-clC_s4)-CO_1-Sus O_{29};

die in Klammern gesetzten Marker liegen in der Immunitätsregion, die anderen außerhalb.

Die Ergebnisse der einzelnen Kreuzungen sind jeweils nur mit bestimmten Lagen von C_s4 vereinbar:

C_s4 x C_{30}Sus N_7: links von Sus N_7 oder weit rechts von C_{30}.

C_s4 x C_{30}Sus O_{29}: rechts von Sus O_{29} oder links von C_{30}.

clC_s4 x CO_1: links von cl, folglich auch von CO_1.

Zusammengenommen ist hieraus auf eine Lage von C_s4 links von Sus N_7 zu schließen.

Als Vorhersage für das Ergebnis der Kreuzung i^{434} Sus N_7 x C_s4 ergibt sich, daß die Mehrzahl der Rekombinanten i^{434} Sus^+ kaltsensitiv sein sollten. Tatsächlich sind alle beobachteten nicht kaltsensitiv. Der Widerspruch löst sich mit der Annahme, daß Rekombinanten vom Genotyp C_s4 i^{434} nicht kaltsensitiv sind.

III. DISKUSSION

Hauptziele der vorliegenden Untersuchung waren:

Erstens kaltsensitive Mutanten des Bakteriophagen Lambda aufzufinden

und

zweitens festzustellen, ob ihr Auftreten in charakteristischer Weise auf gewisse Gene beschränkt ist.

Das erste Ziel wurde erreicht. Zum zweiten Ziel ist festzustellen:

Die Mehrzahl der Mutanten ist auf das Gen A konzentriert. Für C_s7 und C_s16 ist die Lage im Gen A durch die negative Komplementierung mit Sus A_{11} nachgewiesen, im Einklang mit den Kreuzungsdaten für die beiden Mutanten. Für C_s1, C_s3, C_s5, C_s9, C_s10, $C_{si}4_3$ und $C_{si}\,4_{10}$ ist das gleiche schon aufgrund der Kreuzungsdaten wahrscheinlich, aber erst durch die Komplementierungsversuche in Doppellysogenen (Tabelle 7) zu belegen. Diese zeigen, daß die genannten Mutanten im selben Cistron liegen wie C_s7 und C_s16. Die Trennbarkeit z.B. von $C_{si}4_{10}$ und C_s7 durch Rekombination und die unterschiedliche Reversionsrate von C_s7 und C_s16 einerseits und der erwähnten weiteren Mutanten andererseits lassen erkennen, daß es sich hier nicht um einen "Hotspot" in dem Sinne handelt, daß ein und dieselbe Mutante unabhängig immer wieder isoliert worden wäre, sondern daß im Gen A ein Bereich vorliegen muß, der durch verschiedene Mutationen zu kalt-

sensitivem Charakter führt. Diese Häufung von Mutanten im Gen A erhält seine Bedeutung dadurch, daß keine der übrigen isolierten kaltsensitiven Mutanten in Kopfgenen lokalisiert sind, obgleich mindestens 6 weitere Kopfgene existieren (41). Die Kartierungs- und Komplementierungsdaten zusammengenommen, ergeben auch für die 7 in Schwanzgenen gefundenen Mutanten die Verteilung auf nur 2 Cistren von 11 bekannten und zwar auf J (C_s6, C_s8, $C_{si}4_{30}$) und G; im letzten Falle sind mindestens zwei Mutationsorte vorhanden, repräsentiert durch $C_{si}4_5$ und C_s12 einerseits, $C_{si}4_6$ und C_s2 andererseits. Die einzige nicht als Kopf- oder Schwanzmutante gekennzeichnete kaltsensitive Mutante C_s4 liegt links der Immunitätsregion im Gen N, wie sich aus den Komplementierungsversuchen und den diesbezüglichen Kreuzungen mit der Ausnahme der Kreuzung von i^{434} Sus N_7 mit C_s4 ergibt. Das abweichende Ergebnis der letzteren wird später diskutiert.

Unter den bisher isolierten kaltsensitiven Mutanten gibt es keine, die rechts der Immunitätsregion liegt; d.h. in den Genen, die bei der Initiation der DNS-Synthese und bei der Zell-Lysis wirksam sind. Auch im Gen der Integrase fehlen - wie oben erwähnt - kaltsensitive Mutanten möglicherweise völlig. Um eine derartige Aussage statistisch abzusichern, wäre jedoch ein Vielfaches des mit der vorliegenden Arbeit verbundenen Aufwandes erforderlich.

Bei der Diskussion der hohen Reversionsrate der meisten kaltsensitiven Mutanten ist zunächst die

Möglichkeit der Revertantenbildung auf der Platte als technisches Problem zu berücksichtigen. Das träfe für die Mehrzahl der beobachteten Revertanten nur dann zu, wenn sich von Plaques der Normalgröße bis hinab zu kaum noch erkennbaren Plaques solche aller Größen vorfänden. Diese Möglichkeit ist in allen Fällen ausgeschlossen, in denen Selbstkreuzungen niedrigere Revertantenhäufigkeiten geliefert haben, als sie in den Ausgangslysaten vorhanden waren. Bei den meisten kaltsensitiven Mutanten ist daher nach einer anderen Ursache für die beobachtete hohe Reversionsrate zu suchen. Allerdings ist die in Tabelle 6 für einige Mutanten dargestellte noch höhere Reversionsrate zu t_s^+ kaum anders zu verstehen als durch Revertantenbildung auf der Platte, weil anderenfalls die Mehrzahl der t_s^+ Revertanten noch C_s sein müßten; das Gegenteil wurde aber beobachtet. Dafür, daß sich gerade bei kaltsensitiven Mutanten echte Rückmutation mit einer um Größenordnungen gesteigerten Häufigkeit finden sollte, sind plausible Gründe nicht zu finden. Eine Gruppe von Möglichkeiten stellen intra- und extragenische Suppression dar. Die Hinweise auf extragenische Suppression werden weiter unten besprochen. Intragenische Suppression, d.h. das Auftreten sekundärer Mutanten im gleichen Cistron, die den kaltsensitiven Charakter der ursprünglichen Mutation kompensieren, erscheinen plausibel und könnten mit der Häufigkeit von Vorwärtsmutationen in dem betreffenden Gen, wenn nicht mit höherer Wahrscheinlichkeit, auftreten.

Es könnte sein, daß sich einige kaltsensitive Mutanten vom Wildtyp durch den Ersatz eines bestimmten durch ein aequivalentes Codon unterscheiden. Dieser Unterschied brauchte bei höheren Wachstumstemperaturen nicht in Erscheinung zu treten; bei niedrigen Temperaturen könnte die Lesung des Wildtyp-Codons noch ausreichend sein, die des mutierten Codons dagegen nicht. In diese Erklärung würde sich zwanglos die Tatsache fügen, daß sich auch die Sus-Mutanten zu einem großen Teil als kaltsensitiv herausgestellt haben.

Die Daten geben ein sicheres und ein wahrscheinliches Beispiel für extragenische Suppression. Im Falle C_s1 erwiesen sich - wie oben dargelegt - alle davon isolierten C_I-Mutanten als nicht kaltsensitiv. Diese Tatsache an sich stellt extragenische Suppression dar. Als Deutung käme in Betracht, daß das C_I Produkt mit dem Produkt des in C_s1 mutierten Gens, d.h. des Gens A, in direkte Wechselwirkung tritt. Angesichts der vorhandenen Kenntnisse über die Genetik von Lambda ist dies eine äußerst überraschende Schlußfolgerung. Sie kann daher im Augenblick nur eine Arbeitshypothese sein. Außerdem ist natürlich denkbar, daß es auf die Menge eines dritten Genprodukts ankommt, die ihrerseits durch den C^+ bzw. C_I-Charakter gesteuert wäre. Im vegetativen Zyklus sind aber Unterschiede, die auf den C_I oder C^+ Charakter zurückzuführen wären, nicht bekannt.

Auch im Falle von C_s4 ist extragenische Suppression gegeben, sofern die aus der Kreuzung von C_s4 mit i^{434}

Sus N_7 hervorgegangenen i^{434} Sus^+-Phagen Rekombinanten vom Genotyp C_s4 Sus N_7^+ i^{434} sind. Das letztere ist nicht bewiesen, aber sehr wahrscheinlich gemacht durch die Häufigkeit der i^{434} Sus^+ Phagen in der Kreuzung, verglichen mit der Selbstkreuzung von i^{434} Sus_7. Alternativ könnte es sich dabei nur um eine stimulierte Reversion zu Sus N_7^+ durch Anwesenheit von C_s4 handeln, wofür eskeinen Präzedenzfall gibt.

Zur weiteren Untersuchung des Rekombinationssystems von Lambda und vielleicht von Rekombinationsereignissen allgemein, bieten die Rekombinationsdaten dieser Arbeit einen Ansatzpunkt. Die absoluten Rekombinationswerte der einzelnen kaltsensitiven Mutanten mit einem Satz von Sus-Mutanten sind sehr verschieden, außerdem scheinen für viele der kaltsensitiven Mutanten die Rekombinationswerte nach rechts und die nach links jeweils in einem anderen Verhältnis zur Entfernung auf der DNS zu stehen. Doch wurden auch nach den Vorstellungen der Lambda-Genetik völlig irreguläre Rekombinationsergebnisse bei C_s3, C_s5, C_s12 und C_s9 beobachtet. Für C_s3, C_s5 und C_s12 besteht die Irregularität im wesentlichen darin, daß das Intervall von J bis N für die Rekombination auszufallen scheint. Fälle, bei denen der gleiche Eindruck nur aufgrund eines niedrigen Rekombinationswertes mit Sus N_7 entsteht, blieben unberücksichtigt. Der Fall C_s9 ist schwer zu beurteilen, wenn man nicht annehmen will, daß hier das Lambda-Chromosom ausnahmsweise auch im genetischen Sinne in zirkulärer Form vorliegt. Dies wäre bei einer Lage des Mutationsortes

auf den komplementären Einzelstrangenden des Lambda-Chromosoms denkbar.

Im Sinne einer molekularen oder funktionellen Deutung enthält die vorliegende Arbeit keine gesicherten neuen Ergebnisse. Es können aber zwei Arbeitshypothesen vorgeschlagen werden:

1. Das Produkt des Gens A ist bei seiner Funktion erheblichen Konformationsänderungen ausgesetzt und erfährt eine direkte Einwirkung des Immunrepressors.
2. Die Suche nach extragenischer Suppression kaltsensitiver Mutanten kann ein geeignetes Mittel sein, direkte Wechselwirkung zwischen Genprodukten festzustellen.

IV. ZUSAMMENFASSUNG

Es wurden kaltsensitive Mutanten des Bakteriophagen Lambda isoliert und auf ihre genetische Lage im Lambda-Chromosom untersucht. Kaltsensitive Mutanten finden sich bevorzugt im Gen A, in zweiter Linie in den Genen G und J. Eine Mutante befindet sich knapp links der Immunitätsregion in Gen N. Mutanten in den DNS-Vermehrungs-, Zell-Lysis- und Integrationsfunktionen wurden nicht gefunden. Die hohe Reversionsrate der kaltsensitiven Mutanten und spezielle Beobachtungen an einzelnen von ihnen lassen auf häufiges Vorkommen von Suppression, insbesondere auch auf extragenische Suppression schließen. Das Rekombinationsverhalten der kaltsensitiven Mutanten zeigte quantitativ gewisse unerwartete Regelmäßigkeiten.

ABBILDUNG 1

Die genetische Karte von Lambda

Legende: (Schema nach Dove (15), ergänzt nach (41), (21) und (23)).

Die einzelnen Großbuchstaben bezeichnen Cistren.

h: Wirtsbereichmarker (in J).

Dem Prophagen benachbarte Bakteriengene:

Gal: Galactose-Fermentierung
K: Kinase
t: Transferase
e: Epimerase
o: Operator des Gal-Operon

Bio: Biotin-Synthese
UVR_B: Ultraviolett-Resistenz
NIT: Nitrat-Reduktase

ABBILDUNG 1

Die genetische Karte von LAMBDA (Schema nach Dove - 15)

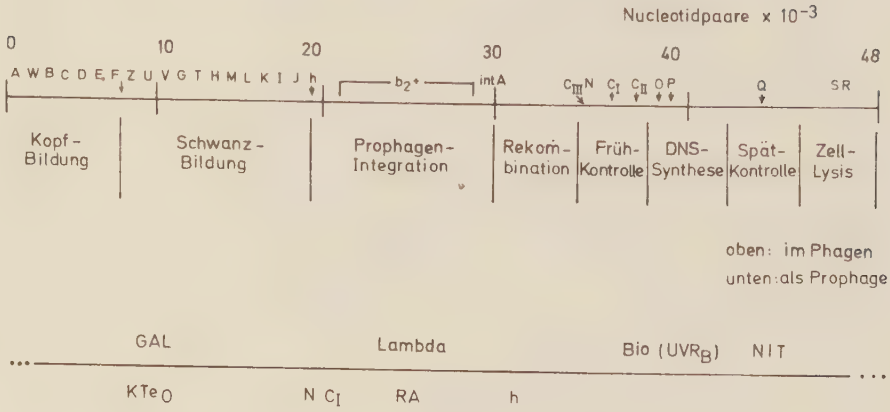

ABBILDUNG 2

Fehlen komplementierender Schwänze im Lysat C_s8

Legende: Lysate von C600 (C_s8) und C600 (λw), UV-induziert und bei 29° C gewonnen, fraktioniert auf Saccharosegradient (5 - 20 %) 80 Minuten, 37.000 U/Min.

Abszisse: Fraktionen des Gradienten

Ordinate: Titer der Fraktion, nach Komplementierungsversuch mit W3110 (λ Sus J_6)-Lysat.

Linke Skala - C_s8
Rechte Skala - Lambda Wildtyp

ABBILDUNG 2

λ Wildtyp
C_s 8
10^6
10^5
10^4
10^3
10^7
10^6
10^5
10^4
3 6 9 12 15 18 21 24 27 30 33 36 39 42 45
Frakt. Nr.

TABELLE 1a

Bakterienstämme (alle abgeleitet von Escherichia coli K12)

Bezeichnung	Eigenschaften	Erhalten von
C600	pm^+, sens.	Dr. A. D. Kaiser
W3350	pm^-, sens.	"
W3101 (λ wild)	pm^-, Lysogen	"
W3101 (434hy)	pm^-, Lysogen für 434hy (31)	"
W3104	pm^+, sens.	"
W3110	pm^-, sens. (Vorläufer von W3350)	Dr. P. Hofschneider
Hfr43	pm^-, sens.	Dr. W. Vielmetter
C600 (λ Sus A_{11})	pm^+, Lysogen für Sus (Mutante von Campbell (7)	Dr. E. Calef
C600 (λ Sus B_1)	"	"
C600 (λ Sus C_{39})	"	"
C600 (λ Sus D_{123})	"	"
C600 (λ Sus E_4)	"	"
C600 (λ Sus G_9)	"	"
C600 (λ Sus H_{12})	"	"
C600 (λ Sus I_2)	"	"
C600 (λ Sus J_6)	"	"
C600 (λ Sus K_{24})	"	"
C600 (λ Sus N_7)	"	"
C600 (λ Sus N_{53})	"	"
C600 (λ Sus O_8)	"	"
C600 (λ Sus O_{29})	"	"
C600 (λ Sus P_3)	"	"
C600 (λ Sus Q_{73})	"	"
C600 (λ Sus Q_{117})	"	"
C600 (λ Sus R_5)	"	"
C600 (λ Sus R_{54})	"	"

TABELLE 1b

Bakteriophagen; abgeleitet von λ wild bzw. 434hy soweit nicht durch UV-Induktion aus vorher erwähnten Lysogenen gewonnen

Bezeichnung	Eigenschaften	Erhalten von
λ C_{30}	C_I Mutante von λ (30)	Dr. A. D. Kaiser
λ CO_1	C_{II} Mutante von λ (30)	"
λ C_{67}	C_{III} Mutante von λ (30)	"
i^{434} Sus N_7	Rekombinante 434hy mit λ Sus N_7 (43)	Dr. M. Ptashne
i^{434} Sus O_{29}	Rekombinante 434hy mit λ Sus O_{29} (43)	"
λ C_{30} Sus N_7	Rekombinante λ C_{30} mit i^{434} Sus N_7	
λ C_{30} Sus O_{29}	Rekombinante λ C_{30} mit i^{434} Sus O_{29}	

TABELLE 2

Übersicht der kaltsensitiven Mutanten

Legende:

Spalte 1 - Herkunft: Mutante abgeleitet von:

Spalte 2 - PW 29° C: Plattierungswahrscheinlichkeit der Mutante (UV-Lysat bei 37° C hergestellt) bei 29° C bezogen auf Titer bei 37° C auf C600.

Spalte 3 - Titer 29° C: Verhältnis der Titer eines UV-Lysats, bei 29° C hergestellt, zu Titer eines UV-Lysats bei 37° C hergestellt. Dargestellt ist das Experiment mit den höchsten ermittelten Werten.

Spalte 4 - Im Bereich von: Cistron, in dem die Mutante nach Kartierungs- und Komplementierungsdaten liegt.

Spalte 5 - Gekoppelt mit: Rekombinationsraten mit anderen kaltsensitiven Mutanten kleiner als 0,005 %

+Ausnahmen: C_s1, C_s3, C_s9, C_s10, $C_{si}{}^{4}10$ = Rekombination untereinander und mit C_s7, C_s16, $C_{si}{}^{4}3$ übertrifft nicht die Reversionsrate von 0,4 % (Tabelle 3).

Spalte 6 - Bemerkungen: Ausführliche Darstellung auf angegebenen Textseiten. t_s = temperatursensitiv, keine Plaquebildung bei 42° C auf C600.

TABELLE 2

1	2	3	4	5	6
Mutante	Herkunft	PW 29° C	Titer 29° C	Im Bereich von	Gekoppelt mit	Bemerkungen
C_s1	λ	$1,4 \times 10^{-3}$	.075	A	+	alle C_I abgeleitet davon sind C_s^+ (S.39)
C_s2	λ	$1,5 \times 10^{-4}$	.068	G	$C_{si}4_6$	nicht kaltsensitiv auf W3110 (S.40) t_s (S.38)
C_s3	λ	$1,1 \times 10^{-3}$	.074	A	+	-
C_s4	λ	$1,3 \times 10^{-4}$	.059	N	-	t_s (S.38)
C_s5	λ	$1,1 \times 10^{-3}$	.071	A	+	-
C_s6	λ	$1,2 \times 10^{-3}$	.071	J	C_s8, $C_{si}4_{30}$	-
C_s7	λ	$5,0 \times 10^{-6}$	.047	A	C_s16, $C_{si}4_3$	Schwanzdonor (S.36)
C_s8	λ	$1,2 \times 10^{-4}$	.050	J	C_s6, $C_{si}4_{30}$	kein Überschuß an Schwänzen (S.37) t_s (S.38)
C_s9	λ	$1,4 \times 10^{-3}$	.077	A	+	-

TABELLE 2 (Fortsetzung)

	1	2	3	4	5	6
Mutante	Herkunft	PW 29° C	Titer 29° C	Im Bereich von	Gekoppelt mit	Bemerkungen
C_s10	λ	$1,0 \times 10^{-3}$	.071	A	+	-
C_s12	λ	$6,0 \times 10^{-4}$	.067	G	$C_{si}45$	-
C_s16	λ	$1,0 \times 10^{-5}$	.050	A	C_s7, $C_{si}43$	Schwanzdonor (S.36)
$C_{si}43$	434hy	$2,5 \times 10^{-4}$	.050	A	C_s7, C_s16	t_s (S.38)
$C_{si}45$	434hy	$2,1 \times 10^{-4}$	.050	G	C_s12	t_s (S.38)
$C_{si}46$	434hy	$2,0 \times 10^{-4}$	.050	G	C_s2	t_s (S.38)
$C_{si}410$	434hy	$2,2 \times 10^{-4}$	.060	A	+	-
$C_{si}430$	434hy	$1,4 \times 10^{-3}$	.060	J	C_s6, C_s8	-
-wild	-	-	.340	-	-	-

TABELLE 2a

Schwach kaltsensitive Mutanten

Legende: PW 29° C: wie Tabelle 2. Keine Prüfung der 'Revertanten' durch Reisolierung. Plattierungswahrscheinlichkeit der Mutanten bei 29° C bezogen auf Titer bei 37° C auf C600.

TABELLE 2a

C_s Mutante	UV-Lysat, PW bei 29° C (Reversionshäufigkeit)
$C_s 11$	$7{,}5 \times 10^{-2}$
$C_s 13$	$6{,}8 \times 10^{-2}$
$C_s 14$	$6{,}2 \times 10^{-2}$
$C_s 15$	$2{,}1 \times 10^{-2}$
$C_s 17$	$4{,}6 \times 10^{-2}$
$C_s 18$	$4{,}2 \times 10^{-2}$
$C_s 19$	$5{,}4 \times 10^{-2}$
$C_s 20$	$3{,}9 \times 10^{-2}$
$C_{si}{}^4 1$	$3{,}5 \times 10^{-2}$
$C_{si}{}^4 2$	$1{,}0 \times 10^{-2}$
$C_{si}{}^4 4$	$2{,}0 \times 10^{-2}$
$C_{si}{}^4 8$	$1{,}7 \times 10^{-2}$
$C_{si}{}^4 21$	$7{,}6 \times 10^{-2}$

TABELLE 3

Rekombination zwischen kaltsensitiven Mutanten

Legende: Häufigkeit der C_s+-Rekombinanten in Prozent. Selektiert bei 29° C auf C600.

Kreuzungsverfahren: Seite 28

TABELLE 3

	C_s1	C_s2	C_s3	C_s4	C_s5	C_s6	C_s7	C_s8	C_s9	C_s10	C_s12	C_s16	$C_{si}4_3$	$C_{si}4_5$	$C_{si}4_6$	$C_{si}4_{10}$	$C_{si}4_{30}$
C_s1	0.4	2.0	0.8	6.0	0.42	4.8	0.7	3.2	0.52	0.5	1.8	0.38	0.6	2.1	2.3	0.56	5.6
C_s2		≦.002	1.4	2.0	1.6	0.31	1.45	0.2	1.02	1.2	0.3	0.9	1.5	0.3	≦.003	1.2	0.8
C_s3			0.4	6.0	0.5	4.0	0.5	4.0	0.35	0.45	3.8	0.4	0.5	4.0	2.3	0.5	4.3
C_s4				≦.003	3.0	2.0	3.0	1.7	3.8	4.0	2.7	3.2	4.5	2.5	2.5	4.1	3.0
C_s5					≦.005	2.3	0.3	1.8	0.51	0.3	2.0	≦.005	0.08	1.8	1.5	0.1	2.0
C_s6						≦.002	2.0	≦.002	1.45	1.6	0.3	2.5	2.8	0.3	0.3	2.9	0.5
C_s7							≦.002	1.5	0.48	0.2	1.6	≦.002	≦.003	1.2	1.5	0.09	1.8
C_s8								≦.003	1.25	2.1	0.3	1.3	1.9	0.2	0.21	2.6	0.4
C_s9									0.2	0.68	0.98	0.46	0.32	1.1	1.0	0.41	1.3
C_s10										0.2	1.7	0.21	0.3	2.0	1.7	0.31	2.7
C_s12											≦.002	1.0	1.8	≦.002	0.2	2.0	0.6
C_s16												≦.002	≦.003	1.2	1.0	0.09	2.2
$C_{si}4_3$													≦.003	1.6	1.7	0.1	2.3
$C_{si}4_5$														≦.003	0.3	2.2	0.9
$C_{si}4_6$															≦.003	1.5	0.7
$C_{si}4_{10}$																0.02	2.8
$C_{si}4_{30}$																	0.42

TABELLE 4

Rekombination der kaltsensitiven Mutanten mit Sus-Mutanten und i^{434}

Legende: Häufigkeit der Sus^+ C_s+ Rekombinanten in Prozent.

Spalte 1 - 15: Titer auf W3350 bei 29° C bezogen auf Titer C600 bei 37° C

B-R: Sus-Mutanten nach Tabelle 1

Spalte 16: $C_s+i\lambda$ -Rekombinanten, Titer auf W3101 (434hy) bei 29° C, bezogen auf Titer bei 37° C auf C600.

Kreuzungsverfahren: S. 29

TABELLE 4

	Selbst	B	C	D	E	G	H	K	I	J	N	O	P	Q	R	i^4
C_s1	0.40	0.73	1.08	1.98	2.00	2.28	2.70	2.00	2.90	2.0	2.32	7.45	7.6	10.0	11.4	10.50
C_s2	≦.002	0.20	0.15	0.12	0.10	0.09	0.02	0.08	0.10	0.14	0.63	0.64	0.66	0.71	0.74	1.30
C_s3	0.40	0.45	0.53	0.81	2.00	2.94	7.2	5.90	6.00	5.90	6.90	7.10	9.00	15.00	16.5	4.50
C_s4	≦.003	1.40	1.50	1.50	1.60	1.47	1.14	0.69	0.60	0.86	0.05	0.31	0.37	1.00	1.10	0.10
C_s5	≦.005	0.54	1.06	1.45	1.70	2.14	3.90	4.10	2.40	2.60	3.20	5.00	6.90	6.20	5.00	2.00
C_s6	≦.002	1.87	2.37	2.87	2.60	2.36	1.14	1.50	0.82	1.04	1.96	3.22	3.08	2.50	3.50	1.30
C_s7	≦.002	0.21	0.22	0.40	0.42	0.42	0.69	0.60	0.83	1.06	0.81	2.15	3.70	1.15	2.20	1.40
C_s8	≦.003	0.93	1.00	1.05	0.80	0.69	0.39	0.20	0.05	0.04	0.81	2.10	1.80	2.00	1.50	2.40
C_s9	0.20	0.37	0.56	2.00	3.00	4.00	13.00	11.00	12.00	18.30	13.00	8.20	8.00	5.20	7.30	11.20
C_s10	0.20	0.37	0.39	0.42	0.75	1.05	1.08	1.46	1.17	1.35	1.17	2.00	3.60	2.40	2.34	1.70
C_s12	≦.002	0.55	0.35	0.32	0.76	0.95	0.94	0.63	0.51	1.05	0.51	0.52	0.52	1.20	0.93	0.67
C_s16	≦.002	0.70	0.70	0.75	0.80	0.86	1.15	1.00	1.20	2.30	1.70	3.10	1.50	1.75	3.60	1.70
$C_{si}{}^4{}_3$	≦.002	0.66	1.74	1.79	2.00	3.55	3.53	2.80	2.94	3.07	8.44	13.00	10.60	12.30	19.4	-
$C_{si}{}^4{}_5$	≦.003	0.23	0.58	0.38	0.20	0.03	0.22	0.32	0.50	0.40	1.40	1.30	1.20	1.16	1.08	-
$C_{si}{}^4{}_6$	≦.003	0.51	0.37	0.60	0.45	0.11	0.09	0.35	0.50	0.69	2.00	2.10	2.20	3.60	4.00	-
$C_{si}{}^4{}_{10}$	0.02	0.17	0.29	0.27	0.30	0.28	0.37	0.47	0.60	0.72	1.57	1.90	2.10	1.23	1.36	-
$C_{si}{}^4{}_{30}$	0.42	1.20	1.10	1.00	0.90	0.80	0.75	0.69	0.60	0.49	2.63	4.20	4.76	2.84	3.13	-

TABELLE 5

Kaltsensitive Eigenschaften von Sus-Mutanten auf C600

Legende: Plaquebildung bei 29° C auf C600

+ = Normale Plaquebildung

(+) = Bildung winziger Plaques

- = keine Plaquebildung

TABELLE 5

	37° C	29° C
Sus A (11)	+	-
Sus B (1)	+	-
Sus C (39)	+	-
Sus D (123)	+	+
Sus E (4)	+	+
Sus G (9)	+	+
Sus H (12)	+	-
Sus I (2)	+	-
Sus J (6)	+	(+)
Sus K (24)	+	-
Sus N (7)	+	(+)
Sus N (53)	+	(+)
Sus O (8)	+	(+)
Sus O (29)	+	(+)
Sus P (3)	+	+
Sus Q (73)	+	-
Sus Q (117)	+	-
Sus R (5)	+	+
Sus R (54)	+	+

TABELLE 6

Kaltsensitiv-temperatursensitive Mutanten

Legende: Spalte 2 und 3: PW bei 29° C bzw. 42° C: Titer (UV-Lysat der Mutante, bei 37° C hergestellt) bei 29° C bzw. 42° C bezogen auf Titer bei 37° C, alle auf C600.

Spalte 4, 5, 6: Nummern von Plaques, bei 29° C isoliert; gleiche Proben bei 37° C, 29° C und 42° C auf C600 plattiert.

Spalte 7, 8, 9: entsprechend Spalten 4, 5, 6. Plaques bei 42° C isoliert.

$^{+}$: Revertanten mit kleinen Plaques (auch bei 37° C).

TABELLE 6

1	2	3	4	5	6	7	8	9
$C_s t_s$ Mutante	PW bei 29° C	PW bei 42° C		C_s+: Selektion 29° C			t_s+: Selektion 42° C	
				PW bei 29° C	PW bei 42° C		PW bei 29° C	PW bei 42° C
$C_s 2$	$1,5x10^{-4}$	$4,9x10^{-3}$	1. 2.	0.30 0.32	0.97 0.73	3. 4.	0.83 1.10	0.86 0.94
$C_s 4$	$1,3x10^{-4}$	$1,4x10^{-3}$	1. 2.	0.76 0.81	0.84 0.87	3. 4.	1.06 1.04	1.03 0.97
$C_s 8$	$1,2x10^{-4}$	$3,7x10^{-3}$	1. 2.	0.79 0.80	0.006 0.011	3. 4.	0.50 0.63	0.31 0.16
$C_{si} 4_3$	$2,5x10^{-4}$	$5,3x10^{-4}$	1. 2.	0.95 0.86	0.035 0.43	3. 4.	1.00 1.10	0.10 0.18
$C_{si} 4_5$	$2,1x10^{-4}$	$6,2x10^{-5}$	1. 2.	0.30 0.66	0.25 0.60	3. 4. 5. 6+: 7+: 8+:	0.027 0.004 0.008 0.005 0.001 0.001	0.61 0.60 0.43 0.19 0.21 0.99
$C_{si} 4_6$	$2,0x10^{-4}$	$6,4x10^{-6}$	1. 2.	0.66 1.00	0.68 0.73	3. 4. 5. 6+: 7+: 8+:	0.15 0.072 0.065 0.061 0.12 0.14	0.94 0.74 0.74 0.25 0.031 0.89

TABELLE 7

Komplementierungsversuche in Doppellysogenen

Legende: Spalte 2: Lysat bei 29° C bzw. 37° C auf Seite 32 beschrieben.

Leere Stellen:
Kein entsprechendes Experiment ausgeführt.

TABELLE 7

1	2	3	4	5	6
Stamm	Lysat bei	Titer auf: ($\times 10^{-5}$)			Komplementierung
		C600	C600(λ)	C600(434hy)	
C600 (λ wild)	37° C	63,000	0	53,000	
	29° C	2,500	0	2,400	
C600 (C_s1)	37° C	39,000			
	29° C	26			
W3350 (C_s2)	29° C	12			
C600 (C_s3)	37° C	39,000			
	29° C	38			
C600 (C_s4)	37° C	39,000			
	29° C	3.0			
W3110 (C_s4)	29° C	1.0			
C600 (C_s5)	37° C	46,000			
	29° C	8.7			
W3350 (C_s6)	29° C	30			
C600 (C_s7)	37° C	40,000			
	29° C	0.29			
C600 (C_s8)	37° C	20,000			
	29° C	1.9			
W3350 (C_s8)	29° C	9.6			
C600 (C_s9)	37° C	44,000			
	29° C	58			
C600 (C_s10)	37° C	37,000			
	29° C	56			
W3350 (C_s12)	29° C	17			
C600 (C_s16)	37° C	42,000			
	29° C	0.88			
C600 ($C_{si}4_3$)	37° C	19,000	21,000	0	
	29° C	2.9	2.8	0	
W3350 ($C_{si}4_5$)	29° C	4.5			
W3350 ($C_{si}4_6$)	29° C	0.9			
C600 ($C_{si}4_{10}$)	37° C	32,000			
	29° C	6.0	5.6	0	
W3350 ($C_{si}4_{30}$)	29° C	5.5			

TABELLE 7 (Fortsetzung)

1	2	3	4	5	6
Stamm	Lysat bei	Titer auf: ($\times 10^{-5}$)			Komplementierung
		C600	C600(λ)	C600(434hy)	
C600 ($C_{si}4_3$, C_s1)	37° C	54,000	18,000	22,000	
	29° C	8.0	3.1	5.5	-
C600 ($C_{si}4_3$, C_s3)	37° C	81,000	22,000	56,000	
	29° C	18	6.0	12	-
C600 ($C_{si}4_3$, C_s4)	37° C	67,000	20,000	44,000	
	29° C	440	220	280	+
C600 ($C_{si}4_3$, C_s5)	37° C	48,000	15,000	44,000	
	29° C	5.9	1.4	4.5	-
C600 ($C_{si}4_3$, C_s7)	29° C	4.6	2.4	2.0	-
C600 ($C_{si}4_3$, C_s8)	37° C	17,000	1,000	13,000	
	29° C	240	72	150	+
C600 ($C_{si}4_3$, C_s9)	37° C	50,000	13,000	32,000	
	29° C	15	3.5	8.5	-
C600 ($C_{si}4_3$, C_s10)	29° C	8.0	6.9	1.6	-
C600 ($C_{si}4_3$, C_s16)	29° C	3.6	1.2	1.7	-
C600 ($C_{si}4_3$, λw)	37° C	22,000	10,000	12,000	
	29° C	1,700	3,600	1,100	+
C600 ($C_{si}4_{10}$, C_s7)	29° C	2.0	.95	1.0	-
C600 ($C_{si}4_{10}$, C_s8)	29° C	120	52	98	+
W3350 ($C_{si}4_5$, C_s2)	29° C	7.3	3.2	2.6	-
W3350 ($C_{si}4_5$, C_s12)	29° C	4.7	2.2	2.8	-
W3350 ($C_{si}4_5$, C_s8)	29° C	330	130	210	+
W3350 ($C_{si}4_5$, Sus G_9)	29° C	5.5	3.2	1.4	-
W3350 ($C_{si}4_5$, Sus H_{12})	29° C	45	31	18	+
W3350 ($C_{si}4_5$, Sus I_2)	29° C	160	91	100	+
W3350 ($C_{si}4_5$, Sus J_6)	29° C	120	71	52	+
W3350 ($C_{si}4_5$, Sus K_{24})	29° C	200	100	120	+
W3350 ($C_{si}4_6$, C_s2)	29° C	3.0	1.5	2.2	-
W3350 ($C_{si}4_6$, C_s12)	29° C	4.2	1.9	2.2	-

TABELLE 7 (Fortsetzung)

1	2	3	4	5	6
Stamm	Lysat bei	Titer auf: ($x10^{-5}$)			Komplementierung
		C600	C600(λ)	C600(434hy)	
W3350 ($C_{si}4_6$, C_s8)	29° C	400	120	200	+
W3350 ($C_{si}4_6$, Sus G_9)	29° C	2.3	1.7	1.1	-
W3350 ($C_{si}4_6$, Sus H_{12})	29° C	28	20	12	+
W3350 ($C_{si}4_6$, Sus I_2)	29° C	94	42	51	+
W3350 ($C_{si}4_6$, Sus J_6)	29° C	240	170	90	+
W3350 ($C_{si}4_6$, Sus K_{24})	29° C	83	36	42	+
W3350 ($C_{si}4_{30}$, C_s6)	29° C	9.5	4.5	4.3	-
W3350 ($C_{si}4_{30}$, C_s8)	29° C	6.2	1.6	3.8	-
W3350 ($C_{si}4_{30}$, C_s12)	29° C	290	100	150	+
W3350 ($C_{si}4_{30}$, Sus G_9)	29° C	220	150	98	+
W3350 ($C_{si}4_{30}$, Sus H_{12})	29° C	200	110	89	+
W3350 ($C_{si}4_{30}$, Sus I_2)	29° C	41	28	13	+
W3350 ($C_{si}4_{30}$, Sus J_6)	29° C	5.1	2.5	3.1	-
W3350 ($C_{si}4_{30}$, Sus K_{24})	29° C	87	36	49	+
W3110 (i^{434hy}, Sus N_7)	29° C	0.01			
W3110 (Sus N_7)	29° C	0.008			
W3110 (Sus N_{53})	29° C	0.01			
W3110 (C_s4, i^4 Sus N_7)	29° C	2.0	0.7	1.2	-
W3110 (C_s4, Sus N_7)	29° C	1.2			-
W3110 (C_s4, Sus N_{53})	29° C	2.1			-

TABELLE 8

Kreuzungen von C_s4 und cl C_s4

Legende: Spalte 3: Prozent Rekombination: Titer auf Selektionsplatten bezogen auf Titer bei 37° C auf C600.

Spalte 4: Geprüfte Rekombinanten, Phaenotyp: Zahl der Plaques, aus denen Phagenproben entnommen wurden; Ergebnis der Plattierung dieser Proben wie bei der jeweiligen Selektion auf C600 bei 37° C.

$(C_s4)^*$ Schwach supprimierte C_s4, PW bei 29° C etwa 10 %.

TABELLE 8

Kreuzung	Rekombinanten selektiert auf	% Rekomb.	Geprüfte Rekomb. Phaenotyp	Geprüfte Rekomb. Vermuteter Genotyp
$C_s4 \times C_s4$	W3350 bei 29°C	$\leq$0.003 %	5: 5 trübe, C_s^+	C_s4^+
$C_s4 \times$ Sus N_7	W3350 bei 29°C	0.05 %	5: 5 trübe, C_s^+	C_s4^+ Sus N_7^+
$C_s4 \times$ 434hy	W3101(434hy)bei 29°C	0.10 %	5: 5 trübe, C_s^+	C_s4^+ i λ
$C_s4 \times C_{30}$ Sus N_7	W3110 bei 29°C	0.64 %	17 trübe, C_s^+ 22: 1 klare, C_s^+ 4 trübe(C_s^+)*	C_s4^+ Sus N_7^+ C^+ C_s4^+ Sus N_7^+ C_{30} (C_s4)* SusN_7 C^+
$C_s4 \times C_{30}$ Sus O_{29}	W3110 bei 29°C	2.00 %	31: 28 trübe, C_s^+ 3 klare, C_s^+	C_s4^+ Sus O_{29}^+ C^+ C_s4^+ Sus O_{29} C_{30}
cl$C_s4 \times \lambda$ CO_1(C_{II})	C600 bei 37° C (trübe Plaques)	0.13 %	16:16 trübe, C_s^+	C_s4^+ C^+ C_{II}^+
cl$C_s4$xi^{434}SusN_7	W3110 bei 37° C (trübe Plaques)	0.03 %	5: 5 trübe, C_s^+	C_s4 Sus N_7^+ i^{434}
i^{434}SusN_7xi^{434}SusN_7	W3110 bei 37°C	$\leq$0.0005 %	-	-

LITERATURVERZEICHNIS

1. Adelberg, E.A., Mandel, M., and Chen, G.C.C.:
Optimal Conditions for Mutagenesis by N-methyl-N'-Nitro-N-Nitosoguanidine in Escherichia coli K12.
Biochem.Biophys.Res.Comm. 18, 788-795 (1965)

2. Baldwin, R.L., Barrand, P., Fritsch, A., Goldthwaite, D.A., and Jacob, F.:
Cohesive Sites on the Deoxyribonucleic Acids from Several Temperate Coliphages.
J.Mol.Biol. 17, 343-357 (1966)

3. Bode, V.C., and Kaiser, A.D.:
Repression of the C_{II} and C_{III} Cistrons of Phage Lambda in a Lysogenic Bacterium.
Virology 25, 111-121 (1965)

4. Bonhoeffer, F.:
DNA Transfer and DNA Synthesis during Bacterial Conjugation.
Z.Vererbungsl. 98, 141-149 (1966)

5. Brenner, S., Stretton, A.O.W., and Kaplan, S.:
Genetic Code: The 'Nonsense' Triplets for Chain Termination and their Suppression.
Nature 206, 994-998 (1965)

6. Brown, A., and Arber, W.:
Temperature-Sensitive Mutants of Coliphage Lambda.
Virology 24, 237-239 (1964)

7. Campbell, A.:
Sensitive Mutants of Bacteriophage λ .
Virology 14, 22-32 (1961)

8. Campbell, A.:
Episomes.
Advan.Genet. 11, 101-145 (1962)

9. Campbell, A., and Del Campillo-Campbell, A.:
Mutant of the Lambda Bacteriophage Producing a Thermolabile Endolysine.
J.Bacteriol. 85, 1202-1207 (1963)

10. Campbell, A., and Zissler, J.:
The Steric Effect in Lysogenization by Bacteriophage Lambda.
III. Superinfection of Monolysogenic Derivatives of a Strain Diploid for the Prophage Attachment Site.
Virology 28, 659-662 (1966)

11. Caro, L.G.:
The Molecular Weight of Lambda DNA.
Virology 25, 226-236 (1965)

12. Christensen, J.R., and Saul, S.H.:
A Cold-Sensitive Mutant of Bacteriophage T1.
Virology 29, 497-499 (1966)

13. Davis, R., and Davidson, N.:
Electron-Microscopic Visualization of Deletion Mutations.
Proc.Natl.Acad.Sci.U.S. 60, 243-250 (1968)

14. Dove, W.F.:
Action of the Lambda Chromosome.
I. Control of Functions Late in Bacteriophage Development.
J.Mol.Biol. 19, 187-201 (1966)

15. Dove, W.F.:
The Genetics of the Lambdoid Phages.
Ann.Rev.Genetics 2, 305-340 (1968)

16. Dowell, C.E.:
Cold-Sensitive Mutants of Bacteriophage ØX-174.
I. A Mutant Blocked in the Eclipse-Function at Low Temperature.
Proc.Natl.Acad.Sci.U.S. 58, 958-961 (1967)

17. Echols, H., Gingery, R., and Moore, L.:
Integrative Recombination Function of Bacteriophage λ: Evidence for a Site-specific Recombination Enzyme.
J.Mol.Biol. 34, 251-260 (1968)

18. Edgar, R.S., and Lielausis, I.:
Temperature-Sensitive Mutants of Bacteriophage T4D: Their Isolation and Genetic Characterization.
Genetics 49, 649-662 (1964)

19. Eiserling, F.A., and Boy de la Tour, E.:
Capsomeres and Other Structures Observed on some Bacteriophages.
Pathol.et Microbiol. 28, 175-180 (1965)

20. Fischer-Fantuzzi, L.:
Integration of λ and λ b_2 Genomes in Nonimmune Host Bacteria Carrying a λ Cryptic Prophage.
Virology 32, 18-32 (1967)

21. Gingery, R., and Echols, H.:
Mutants of Bacteriophage λ Unable to Integrate into the Host Chromosome.
Proc.Natl.Acad.Sci.U.S. 58, 1507-1514 (1967)

22. Gottesman, M., and Yarmolinsky, M.:
Integration-Negative Mutants of Bacteriophage Lambda.
J.Mol.Biol. 31, 487-505 (1968)

23. Harris, A.W., Mount, D.W.A., Fuerst, C.R., and Siminovitch, L.:
Mutations in Bacteriophage Lambda Affecting Host Cell Lysis.
Virology 32, 553-569 (1967)

24. Hogness, D.S., Doerfler, W., Egan, J.B., and Black, L.W.:
The Position and Orientation of Genes in λ and λ dg DNA.
Cold Spring Harbor Symp.Quant.Biol. 31, 129-138 (1966)

25. Horiuchi, T., and Inokuchi, H.:
Temperature-Sensitive Regulation System of Prophage Lambda Induction.
J.Mol.Biol. 23, 217-224 (1967)

26. Jacob, F., et Campbell, A.:
Sur le Systéme de repression assurant l'immunité chez les bactéries lysogènes.
Compt.Rend. 248, 3219-3221 (1959)

27. Jacob, F., Sussman, R., et Monod, J.:
Sur la nature du répresseur assurant l'immunité des bactéries lysogènes.
Comp.Rend. 254, 4214-4216 (1962)

28. Joyner, A., Isaacs, L.N., Echols, H., and Sly, W.S.:
DNA Replication and Messenger RNA Production after Induction of Wild-Type λ Bacteriophage and λ Mutants.
J.Mol.Biol. 19, 174-186 (1966)

29. Kaiser, A.D.:
A Genetic Study of the Temperate Coliphage λ .
Virology 1, 424-443 (1955)

30. Kaiser, A.D.:
Mutants in a Temperate Bacteriophage Affecting its Ability to Lysogenize Escherichia coli.
Virology 3, 42-61 (1957)

31. Kaiser, A.D., and Jacob, F.:
Recombination between Related Temperate Bacteriophages and the Genetic Control of Immunity and Prophage Location.
Virology 4, 509-521 (1957)

32. Kaiser, A.D., and Inman, R.B.:
Cohesion and the Biological Activity of the Bacteriophage Lambda DNA.
J.Mol.Biol. 13, 78-91 (1965)

33. Kaiser, A.D.:
On the Internal Structure of Bacteriophage Lambda.
J.Gen.Physiol. 49, Pt.2, 171-178 (1966)

34. Kemp, C.L., Howatson, A.F., and Siminovitch, L.:
Electron Microscopic Studies of Mutants of Lambda Bacteriophage.
I. General Discription and Quantitation of Viral Products.
Virology 36, 490-502 (1968)

35. Lieb, M.:
Studies of Heat-inducible Lambda Bacteriophage.
I. Order of Genetic Sites and Properties of Mutant Prophages.
J.Mol.Biol. 16, 149-163 (1966)

36. Liedke-Kulke, M., and Kaiser, A.D.:
Genetic Control of Prophage Insertion Specificity in Bacteriophages λ and 21.
Virology 32, 465-474 (1967)

37. Liedke-Kulke, M., and Kaiser, A.D.:
The C-Region of Coliphage 21.
Virology 32, 475-481 (1967)

38. MacHattie, L.A., and Thomas, C.A., Jr.:
DNA from Bacteriophage Lambda: Molecular Length and Conformation.
Science 144, 1142-1144 (1964)

39. O'Donovan, G.A., and Ingraham, J.L.:
Cold-Sensitive Mutants of Escherichia coli Resulting from Increased Feedback Inhibition.
Proc.Natl.Acad.Sci.U.S. 54, 451-457 (1965)

40. Ogawa, T., Tomizawa, J.I., Fuke, M.:
Replication of Bacteriophage DNA.
II. Structure of Replicating DNA of Phage Lambda.
Proc.Natl.Acad.Sci.U.S. 60, 861-865 (1968)

41. Parkinson, J.S.:
Genetics of the Left Arm of the Chromosome of Bacteriophage Lambda.
Genetics 59, 311-325 (1968)

42. Ptashne, M.:
Isolation of the λ Phage Repressor.
Proc.Natl.Acad.Sci.U.S. 57, 306-313 (1967)

43. Ptashne, M., and Hopkins, N.:
Operators Controlled by Lambda Phage Repressor.
Proc.Natl.Acad.Sci.U.S. 60, 1282-1287 (1968)

44. Radding, C.M., and Shreffler, D.C.:
Regulation of λ Exonuclease.
II. Joint Regulation of Exonuclease and a New λ Antigen.
J.Mol.Biol. 18, 251-261 (1966)

45. Radding, C.M., Szpirer, J., and Thomas, R.:
The Structural Gene for λ Exonuclease.
Proc.Natl.Acad.Sci.U.S. 57, 277-283 (1967)

46. Schuster, H.:
Persönliche Mitteilung

47. Signer, E.R., and Beckwith, J.R.:
Transposition of the Lac Region of Escherichia coli. III. The Mechanism of Attachment of Bacteriophage Ø 80 to the Bacterial Chromosome.
J.Mol.Biol. 22, 33-51 (1966)

48. Signer, E.R.:
Lysogeny: The Integration Problem.
Ann.Rev.Microbiol. 22, 451-488 (1968)

49. Skalka, A., Butler, B., and Echols, H.:
Genetic Control of Transcription during Development of Phage λ .
Proc.Natl.Acad.Sci.U.S. 58, 576-583 (1967)

50. Strack, H., and Kaiser, A.D.:
On the Structure of the Ends of Lambda DNA.
J.Mol.Biol. 12, 36-49 (1965)

51. Studier, F.W.:
Sedimentation Studies of the Size and Shape of DNA.
J.Mol.Biol. 11, 373-390 (1965)

52. Taylor, K., Hradecna, Z., and Szybalski, W.:
Asymmetric Distribution of the Transcribing Regions on the Complementary Strands of Coliphage λ DNA.
Proc.Natl.Acad.Sci.U.S. 57, 1618-1625 (1967)

53. Thomas, C.A., Jr., and MacHattie, L.A.:
The Anatomy of Viral DNA Molecules.
Ann.Rev.Biochem. 36, 485-518 (1967)

54. Thomas, R., and Bertani, L.E.:
On the Control of the Replication of Temperate Bacteriophage Superinfecting Immune Hosts.
Virology 24, 241-253 (1964)

55. Weigle, J.:
Assembly of Phage Lambda in vitro.
Proc.Natl.Acad.Sci.U.S. 55, 1462-1466 (1966)

56. Wu, R., and Kaiser, A.D.:
Mapping the 5'-Terminal Nucleotides of the DNA of Bacteriophage λ and Related Phages.
Proc.Natl.Acad.Sci.U.S. 57, 170-177 (1967)

57. Yamagishi, H., Nakamura, K., and Ozeki, H.:
Cohesion Occuring between DNA Molecules of Temperate Phages Ø 80 and Lambda or Ø 80.
Biochem.Biophys.Res.Commun. 20, 727-732 (1965)

58. Young, E.T., and Sinsheimer, R.L.:
Vegetative Bacteriophage λ DNA.
II. Physical Characterization and Replication.
J.Mol.Biol. 30, 165-200 (1967)

Lebenslauf

14.9.1941	in Shreveport, Louisiana, USA, geboren.
1947-1955	Elementarschulbesuch in Laurel, Mississippi und Calumet City, Illinois, USA.
1955-1959	Besuch der Thornton Fractional Township High School in Calumet City, Illinois, USA.
1960-1965	Studium der Naturwissenschaften (Fachschaft Mikrobiologie) an der Purdue University, Lafayette, Indiana, USA, bis zum B.S.; Januar 1965
1966-1969	Anfertigung der Dissertation im Max-Planck-Institut für Virusforschung, Biologisch-Medizinische Abteilung, Tübingen. (Wissenschaftliche Anleitung: Professor Dr. W. Seyffert und Dr. H.B. Strack)

Meine akademischen Lehrer an der Purdue University waren die Professoren:

A. Corley, H. Fayle, H. Garner, C. Goodknight, S. Hartsell, H. Mellon, F. Neidhardt, S. Moskowitsch, K. Wilson.

An der Universität Tübingen (Studienfächer Genetik, Mikrobiologie, Biochemie) die Professoren (bzw. Dozenten oder Lehrbeauftragten):

A. Anderer, F. Bonhoeffer, D. Dütting, W. Frank, A. Gottschalk, J. Guglielmi, K. Mundry, W. Reichardt, W. Schäfer, G. Schramm, W. Seyffert, H. Strack, G. Weitzel, U. Weser, H. Zähner.

difo-druck schmacht · bamberg